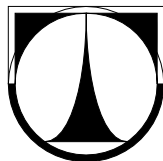


TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Liberec 2013

Michal Šeps

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny

Wet Electrospinning

Bakalářská práce

Autor: **Michal Šeps**
Vedoucí práce: Ing. Eva Košťáková, Ph.D.

V Liberci 17. 5. 2013

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal Šeps**
Osobní číslo: **M10000076**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Elektrostatické zvlákňování do kapaliny**
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

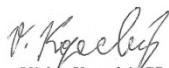
1. Seznamte se podrobně s principy elektrostatického zvlákňování.
2. Vypracujte rešerši týkající se elektrostatického zvlákňování na hladinu kapaliny a do kapaliny.
3. Vypracujte návrh zařízení pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny, uskutečňte ho a proveďte sérii experimentů.
4. Diskutujte výsledky, vyvoďte závěry a navrhnete možná vylepšení pro další studie v této oblasti.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 45 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

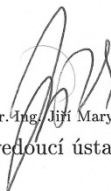
- [1] RAMAKRISHNA, S. An Introduction to Electrospinning And Nanofibers, World Scientific Publishing, Singapore, 2005 ISBN 981-256-415-2.
[2] YOKOYAMA, Y. et al. Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiiform nanofiber 3-dimensional fabric, Materials Letters, 2009, vol. 63, s. 754-756.
[3] ASHRAF, A., A., Awad Kh. A. Wet-electrospun CuNP/carbon nanofibril composites: potential application for micro surface-mounted components, Appl Nanosci, 2012, vol.2, s. 55-61.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Eva Košťáková, Ph.D.
Katedra netkaných textilií

Datum zadání bakalářské práce: 18. října 2012
Termín odevzdání bakalářské práce: 17. května 2013


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 18. října 2012

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem. 0

Datum

Podpis

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí práce Ing. Evě Košťákové, Ph.D. za odborné vedení a užitečné rady během řešení bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Janě Horákové a centralizovanému rozvojovému projektu č. 12091 s názvem Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL za umožnění biologických experimentů a Ing. Denise Zálešákové za pomoc v laboratořích. Závěrem bych velice rád poděkoval rodičům za pomoc a podporu během celého studia a své přítelkyni a přátelům za morální podporu při studiu.

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem elektrostatického zvlákňování do kapaliny. V práci je uveden přehled způsobů výroby polymerních nanovláken s důrazem na elektrostatické zvlákňování a jsou popsány teoretické základy elektrostatického zvlákňování. Dále jsou shrnuty poznatky získané rešerší zaměřenou na elektrostatické zvlákňování do kapaliny.

Experimentální část se zabývá přípravou nanovláknenných struktur z roztoku polykaprolaktonu. Byla navržena a sestavena laboratorní aparatura k elektrostatickému zvlákňování do kapaliny a byla ověřena její vhodnost pro přípravu nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny. Bylo provedeno srovnání struktury materiálů připravených za různých experimentálních podmínek. Byl zjištěn zásadní vliv složení lázně kolektoru na morfologii výsledného nanovláknenného materiálu. Výsledky prokázaly, že materiál vyrobený elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny má odlišnou strukturu zastoupení průměrů vláken a větší pórovitost ve srovnání s materiálem vyrobeným pomocí klasického elektrostatického zvlákňování. V závěru práce je experimentálně ověřena možnost použití takto připravených struktur jako scaffoldů v oblasti tkáňového inženýrství.

Klíčová slova

polykaprolakton, elektrostatické zvlákňování do kapaliny, nanovláknena, tkáňové inženýrství, tkáňové lešení

Abstract

The bachelor thesis deals with the study of wet electrospinning. The work provides an overview of methods of producing polymer nanofibers with an emphasis on electrostatic spinning. There is also described the theoretical foundation of electrospinning. The thesis summarizes the findings, which were obtained by research, focusing on electrostatic spinning into a liquid.

Experimental part deals with the production of nanofiber structures from polycaprolactone solution using electrospinning into the liquid. At the beginning the apparatus for wet electrospinning was put together. Experimental part compares the structure of materials which were produced through wet electrospinning. The work also compares the structure of materials prepared under different experimental conditions.

The composition of liquid collector has a major influence on the morphology of the resulting nanofiber material. The results showed that the material produced by electrospinning into a liquid have a different structure as well as representation of fibers diameters and greater porosity, compared with the material produced by standard electrospinning. In the conclusion of the thesis is experimentally verified the possibility of the use of the prepared structures as scaffolds for tissue engineering.

Keywords

polycaprolactone, wet electrospinning, nanofibers, tissue engineering, scaffold

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 6 |
| Klíčová slova | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| Keywords..... | 7 |
| Seznam použitých termínů a zkratek..... | 10 |
| Úvod | 11 |
| 1 Teoretická část..... | 12 |
| 1.1 Nanovláknna | 12 |
| 1.1.1 Přehled způsobů výroby polymerních nanovláken..... | 12 |
| 1.2 Elektrostatické zvlákňování (electrospinning)..... | 13 |
| 1.2.1 Historický vývoj | 13 |
| 1.2.2 Základní principy elektrostatického uspořádání..... | 15 |
| 1.2.3 Fáze elektrostatického zvlákňování..... | 16 |
| 1.2.4 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování..... | 21 |
| 1.2.5 Procesní parametry | 22 |
| 1.2.6 Modifikace elektrostatického zvlákňování..... | 23 |
| 1.2.7 Charakterizace různých nanovláknenných struktur polymerů | 26 |
| 1.3 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny (Wet Electrospinning)..... | 27 |
| 1.3.1 Zvlákňování z iontových rozpouštědel..... | 30 |
| 1.3.2 Zvlákňování z neiontových rozpouštědel | 34 |
| 1.4 Aplikace nanovláken..... | 39 |
| 1.4.1 Filtrace a ochranné materiály | 39 |
| 1.4.2 Nano-kompozity | 40 |
| 1.4.3 Senzory | 40 |
| 1.4.4 Biomedicínské aplikace | 40 |
| 2 Experimentální část | 42 |
| 2.1 Použité materiály | 42 |
| 2.2 Použité metody | 42 |
| 2.2.1 Měření povrchového napětí | 42 |
| 2.2.2 Měření elektrické vodivosti..... | 43 |
| 2.2.3 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny..... | 43 |
| 2.2.4 Charakterizace připravených nanovláken..... | 45 |
| 2.2.5 Mikrobiologické testování in vitro | 46 |
| 3 Výsledky měření a diskuze..... | 48 |
| 3.1 Povrchové napětí..... | 48 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2 | Elektrická vodivost | 49 |
| 3.3 | Elektrostatické zvlákňování do kapaliny | 49 |
| 3.3.1 | Vliv parametrů lázně kolektoru | 50 |
| 3.3.2 | Aparatura pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny | 59 |
| 3.4 | Mikrobiologické testy | 60 |
| | Závěr | 63 |
| | Seznam literatury | 64 |
| | Příloha A - Závislost četnosti vláken na jejich průměru pro roztoky kolektoru s různým obsahem ethanol | 68 |
| | Příloha B - Snímky z elektronového mikroskopu vzorků připravených do koagulačních lázní s různými koncentracemi ethanolu | 73 |

Seznam použitých termínů a zkratek

| | |
|------------|--|
| PCL | polykaprolakton |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| PGA | kyselina polyglykolová |
| PLA | kyselina polymléčná |
| PLGA | kopolymer kyseliny mléčné a glykolové |
| PTFE | polytetrafluorethylen |
| PBS | fosfátový pufr |
| DNEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium bromid |
| IPA | isopropanol |
| PI | propidium jodid |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| σ | povrchové napětí |
| F_G | gravitační síla |
| F_E | elektrická síla |
| r_0 | poloměr kapky polymeru bez působení napětí |
| r | poloměr kapky při působení napětí |
| R | vnitřní poloměr kapiláry |
| ρ | hustota |
| g | gravitační zrychlení |
| U | napětí |
| U_c | kritické napětí při kterém dochází k elektrostatickému zvlákňování |
| L | vzdálenost jehly od kolektoru |
| ϵ | permitivita média |
| β | tvarový faktor kapky |
| Q_R | povrchový náboj kapky polymeru |
| h | délka kapiláry |
| d | průměr trysky polymeru |
| v | rychlost trysky polymeru |
| E | intenzita elektrického pole |
| I | proud tekoucí tryskou polymeru |
| k | bezrozměrná vodivost roztoku |

Úvod

V současné době se věda zabývá interdisciplinárním propojením mezi chemií, molekulární biologii, materiálovým inženýrstvím a dalšími obory s cílem pochopit mechanismy a nalézt nové nanomateriály s unikátními vlastnostmi [1]. Důležitým oborem v oblasti nanotechnologií je vývoj a výzkum nanovláknenných materiálů, přičemž velká pozornost je zaměřena na netkané materiály.

Elektrostatické zvlákňování představuje jednoduchý a efektivní způsob výroby netkaných nanovláknenných materiálů se zajímavými charakteristikami. V posledních letech došlo k prudkému rozvoji této technologie, která umožňuje výrobu z anorganických i organických materiálů. Přesto neumožňuje vytvářet a kontrolovat třírozměrnou strukturu připravovaného materiálu. Proto byla vyvinuta metodika elektrostatického zvlákňování do kapaliny, která umožňuje výrobu třírozměrných struktur včetně ovládání jejich morfologie (hustoty vláken, pórovitosti apod.). Velký rozvoj zaznamenalo tkáňové inženýrství, kdy se nanovláknenné materiály uplatňují jako scaffoldy pro adhezi a proliferaci buněk, kdy hraje morfologie klíčovou roli [2] [3]. Rozvoj výroby nanovláknenných materiálů umožňuje rozvoj řady nových technologických a medicínských aplikací.

Tato práce je zaměřena na přípravu třírozměrných nanovláknenných materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny z roztoku polykaprolaktonu (PCL), který byl zvolen především z důvodu ověřených vlastností z minulých prací a také vzhledem k jeho vhodnosti ve tkáňovém inženýrství (biokompatibilitě, biodegradabilitě).

Cílem této bakalářské práce je podrobné seznámení se s principy elektrostatického zvlákňování, především pak jeho modifikací - elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny. Experimentální část je zaměřena na zkonstruování zařízení pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny a provedení série experimentů s důrazem na vliv povrchového napětí na výslednou strukturu materiálu. V závěru práce pak ověřit možnost využití takto připravených materiálů jako lešení pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu.

1 Teoretická část

1.1 Nanovláknna

Nanovláknna patří do skupiny nanomateriálů, jejichž průměr je menší než 1 μm . Struktura nanovláken – zejména velký měrný povrch, vysoká pórozita nebo průměr vláken jsou příčinou unikátních vlastností, které přináší mnoho nových aplikací v různých odvětvích [4].

1.1.1 Přehled způsobů výroby polymerních nanovláken

Polymerní nanovláknna mohou být připravena několika způsoby: tažením, šablonovou syntézou, fázovou separací, samouspořádáváním, anebo elektrostatickým zvlákňováním.

Tabulka 1: Přehled možných příprav nanovláken [5]

| Proces | Výhody | Nevýhody |
|------------------------------------|--|---|
| Tažení | Minimální požadavky na vybavení. | Diskontinuální proces, nelze řídit průměr vláken. |
| Šablonová syntéza | Snadná příprava vláken s různým průměrem – použití forem s odlišnou velikostí pórů. | — |
| Fázová separace | Minimální požadavky na vybavení. Přímá výroba nanovláknenných matric. Mechanické vlastnosti lze snadno upravit změnou koncentrace polymeru. | Pouze pro specifické polymery. |
| Samouspořádávání | Vhodné k přípravě menších vláken. | Komplexní proces. |
| Elektrostatické zvlákňování | Ekonomické. Kontinuální výroba nanovláken. | Nestabilita trysky polymeru. |
| Odstředivé zvlákňování | Výroba z mnoha různých materiálů, snadná kontrola procesních parametrů. | — |

1.1.1.1 Tažení (drawing)

Tažení nanovláken se provádí za pomoci mikropipety s průměrem několika milimetrů. Mikropipeta je ponořena do kapaliny a následně vytahována rychlostí $1 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$. Vytažené vlákno je následně zachyceno na povrchu dotykem konce mikropipety [5].

1.1.1.2 Šablonová syntéza (template synthesis)

Šablonová syntéza využívá forem (šablon) k výrobě požadované struktury materiálu. Pro výrobu nanovláken se používá membrána z oxidů kovů s průměrem pórů od několika až po desítky nanometrů. Pomocí tlaku vody je polymer tlačěn skrz póry šablon. Po kontaktu se stabilizačním roztokem polymer tuhne a vznikají nanovlákná [5].

1.1.1.3 Fázová separace (phase separation)

Při této metodě se nejprve polymer smísí s rozpouštědlem dříve, než proběhne gelování. Mechanismus této metody, jak vyplývá z názvu, spočívá v oddělení fází díky fyzikální neslučitelnosti. Jedna z fází (rozpuštědlo) je poté vyextrahována a zůstává pouze pevná složka. Podrobný postup přípravy nanovláken metodou fázové separace je popsán v [5].

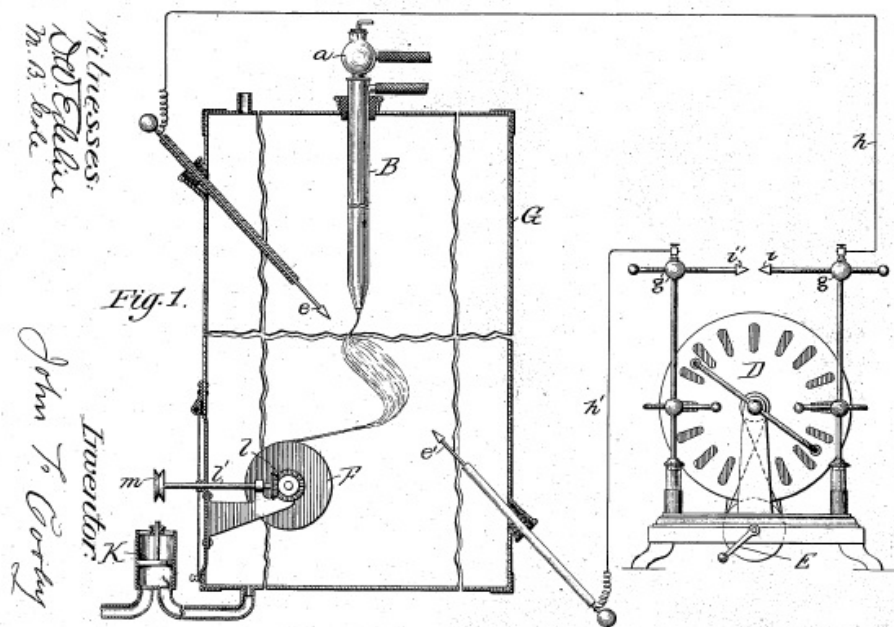
1.1.1.4 Samuspořádání (Self-assembly)

Metoda využívá k přípravě nanovláken menší stavební bloky (molekuly), které se seskupují do větších útvarů. Příčinou samuspořádávání jsou intermolekulární síly, které působí mezi menšími jednotkami. Intermolekulární síly jsou příčinou vzniku větších celků, které následně určují tvar makromolekulárních nanovláken [5].

1.2 Elektrostatické zvlákňování (electrospinning)

1.2.1 Historický vývoj

První elektrostatické rozprašování kapaliny bylo popsáno Jeanem-Antoinem Nollem roku 1750, tedy mnohem dříve, než byl tento termín poprvé použit. První provedené elektrostatické zvlákňování nanovláken z roztoku polymeru bylo popsáno v roce 1902 J. F. Cooleyem a W. J. Mortonem [6].



Obr. 1: Aparatura pro elektrostatické zvlákňování z roku 1902 [6]

O čtvrt století později patentoval Formhals vylepšenou verzi aparatury k elektrostatickému zvlákňování. Poprvé uskutečnil elektrostatické zvlákňování acetátových vláken z acetonu. Jako kolektor použil systém, který se mohl pohybovat, čímž bylo možno vlákna částečně orientovat během zvlákňování [5].

V šedesátých letech dvacátého století zásadně přispěl k základnímu pochopení chování kapky umístěné v elektrickém poli Taylor. Rozvinul techniku potřebnou k elektrostatickému zvlákňování a popsal výrobu netkaných nanovláknenných vrstev mnoha termoplastů (polykarbonátů, polyuretanů). Za použití kovových mřížek získal různě vzorované rohože s nerovnoměrnou hustotou vláken. Ve svém patentu označuje viskozitu, dielektrickou konstantu, vodivost a nestálost rozpouštědla za klíčové výrobní parametry elektrostatického zvlákňování [5].

Přestože tyto objevy položily základy techniky elektrostatického zvlákňování, současné chápání této metody je výsledkem objevů posledních dvou dekad. Tyto objevy vedly k obnovení zájmu o tuto metodu.

V současné době je v laboratořích využíváno téměř shodné zařízení jako v minulosti. Dostupnost stabilních napájecích zdrojů a přesných dávkovacích čerpadel k regulování množství přiváděného polymeru vede k vyšší kvalitě produkovaných nanovláken [5].

1.2.2 Základní principy elektrostatického uspořádání

Elektrostatické zvlákňování je proces, který slouží k výrobě netkaných, nanovláknenných materiálů z roztoku polymeru nebo jeho taveniny působením vysokého napětí. Při tomto procesu vznikají vlákna s průměrem menším než 1 μm . Nanovláknna mohou vytvářet netkané textilní vrstvy, orientované vlákenné svazky a dokonce trojrozměrné strukturované nosiče – všechny s velkým měrným povrchem a vysokou pórovitostí. Elektrostatické zvlákňování je proces podrobně popsany v několika monografiích [5] [7] [8] [9].

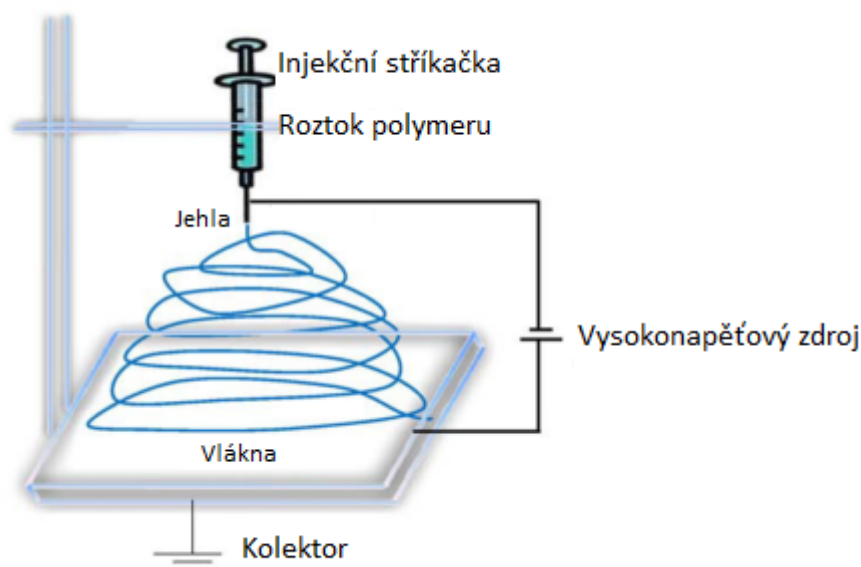
Základní vybavení potřebné k uskutečnění elektrostatického zvlákňování tvoří:

1. Viskózní roztok polymeru nebo tavenina polymeru.
2. Elektroda, která je v kontaktu s roztokem polymeru.
3. Stejnosměrný (lze použít též střídavý [5]) vysokonapěťový zdroj připojený k elektrodě.
4. Kolektor, který je uzemněn nebo opačně nabit k zachycení vyrobených vláken.

Jednoduchou aparaturu k elektrostatickému zvlákňování může tvořit skleněná pipeta s roztokem polymeru zakončená kapilárou, která dodává několik mililitrů roztoku polymeru. Viskozita polymeru musí být dostatečná, aby nedocházelo k samovolnému odkapávání polymeru vlivem gravitace. Pipeta je umístěna několik centimetrů (10-20 cm) nad kovovým kolektorem, který je uzemněn. Elektroda ponořená v roztoku polymeru je připojena na kladný pól vysokonapěťového zdroje. Napětí se pohybuje mezi 10 až 20 kV, přičemž záleží na několika faktorech, které popisují níže.

Působením vysokého napětí na kapku polymeru vzniká kuželovitý tvar. Vzniklá tryska polymeru se pohybuje směrem k uzemněnému kolektoru a vznikají nanovláknna. Vysoká hustota nábojů na povrchu vlákna způsobí, že vlákno je elektricky nestabilní – dochází k tzv. bičování. Bičování způsobuje rozvětvení vláken – jediné vlákno vzniklé z kapky svým rychlým pohybem dává vzniku četným nanovláknům. Vzniklý materiál obvykle tvoří jediné dlouhé vlákno, které je náhodně uspořádané na plochu kolektoru. Rozpouštědlo, které tvoří až 80 % roztoku, se během letu vlákna odpaří. Je nutné volit vhodnou teplotu a vzdálenost mezi jehlou a kolektorem tak, aby byl čas k odpaření dostatečný. V ideálním případě dopadá vlákno na kolektor zcela suché. Zbývající

povrchový náboj se při dopadu na uzemněný kolektor okamžitě odvede. Jednotlivé fáze a parametry elektrostatického zvlákňování jsou popsány níže [5].



Obr. 2: Typické schéma vertikálního uspořádání elektrostatického zvlákňování [8]

1.2.3 Fáze elektrostatického zvlákňování

1.2.3.1 Vznik kapky (droplet generation)

Přesto, že existují metody elektrostatického zvlákňování, které nepotřebují kapku polymeru k vlastnímu zvlákňování, je ve většině laboratorních studií formování a nabíjení kapky zahajovacím krokem elektrostatického zvlákňování.

Obvykle je zásobní roztok polymeru tlačěn kapilárou (jehlou) velmi malou objemovou rychlostí. V případě absence napětí se kapky tvoří na konci kapiláry a poté padají vlivem gravitační síly.

Za předpokladu, že povrchové napětí kapaliny (δ) a gravitační síla (F_G) jsou jediné působící síly na meniskus kapky, je poloměr kapky (r_0) dán vztahem:

$$r_0 = \left(\frac{3R\delta}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad [5] \quad (1)$$

kde R je vnitřní poloměr kapiláry, ρ je hustota kapaliny a g je gravitační zrychlení.

Toto „odkapávání“ může pokračovat i v přítomnosti slabého elektrického pole. Přiložením dostatečně velkého napětí bude elektrická síla (F_E) spolu s gravitační silou (F_G)

působit proti povrchovému napětí - pak $F_\delta = F_E + F_G$ a udržitelný poloměr kapky na hrotu kapiláry klesne na r ($r < r_0$). [5]

V případě laboratorního elektrostatického zvlákňování, kdy je na kapiláru přiloženo kladné napětí (U), ve vzdálenosti (L) od kolektoru pro elektrickou sílu (F_E) pro systém platí rovnice:

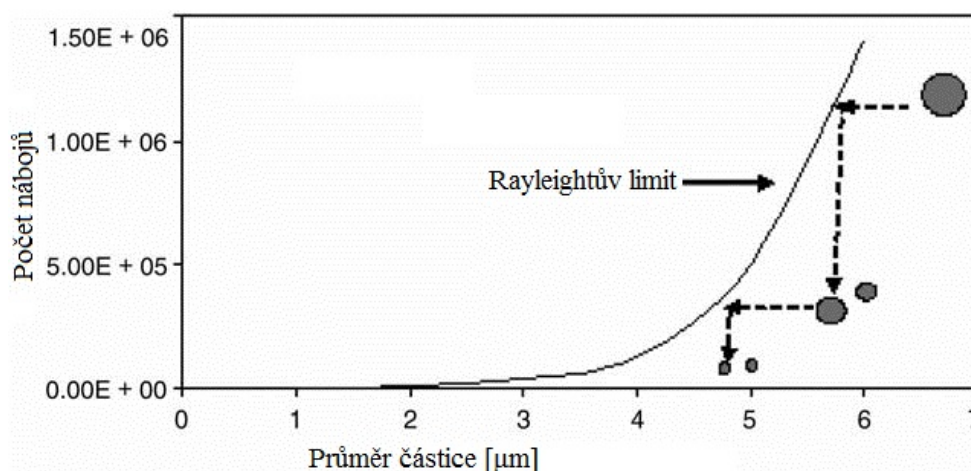
$$F_E = \frac{(4\pi\epsilon U^2)}{\left[\ln\left(\frac{4L}{R}\right)^2\right]} \quad [5] \quad (2)$$

kde ϵ je permitivita média (nejčastěji vzduchu).

Pro poloměr kapky pak platí:

$$r = \left\{ \left(\frac{3}{2\rho g} \right) \left[R\delta - \frac{(2\epsilon U^2)}{\left(\ln\left(\frac{4L}{R}\right)\right)} \right] \right\}^{\frac{1}{3}} \quad [5] \quad (3)$$

S rostoucím napětím roste poloměr, dokud není kapka natolik nestabilní ($U=U_C$), že dojde k elektrostatickému zvlákňování. Působením elektrického pole dojde k nabití kapky polymeru, která je vodivá. Je-li např. kapilára nabita kladně, kladný náboj se kumuluje na povrchu kapky a záporný uvnitř, dokud elektrické pole kapky není nulové. Oddělením nábojů vznikne síla, která působí proti povrchovému napětí. Rychlost pohybu nabitých částic je dána velikostí elektrického pole a mobilitou nabitých částic. Pro elektrické pole intenzity typické pro elektrostatické zvlákňování (10^5 V/m) byla odhadnuta driftová rychlost $\sim 0,15$ m/s. Rychlost proudu polymeru při běžném elektrostatickém zvlákňování je však mnohem vyšší, typicky 10 m/s. Nabité částice se proto musí pohybovat srovnatelnou rychlostí ve směru proudu [5].



Obr. 3: Schématické znázornění exploze nabitě kapky polymeru [5]

Pro stabilitu elektricky nabité kapky, formované na konci kapiláry, je nutné, aby síla povrchového napětí překročila vnější repulzní coulombické síly:

$$F_E \leq g\rho \left[\left(\frac{r^2}{\beta} \right) - V \right] \quad [5] \quad (4)$$

kde β je tvarový faktor pro kapku.

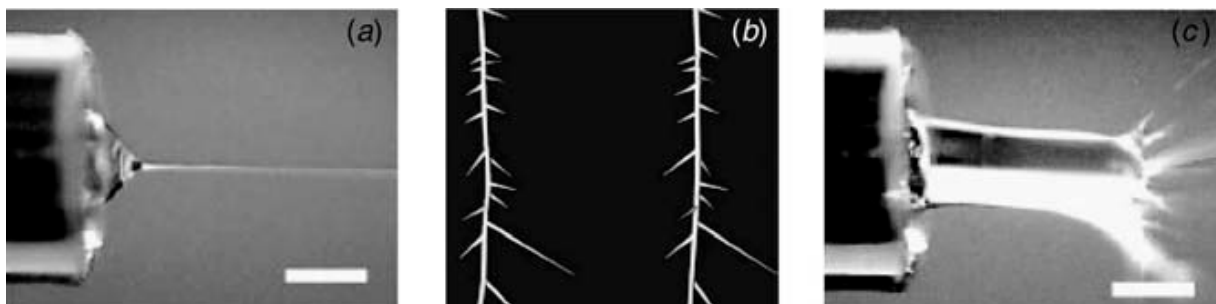
Maximální povrchový náboj (Q_R), který je kapka schopna akumulovat ve vakuu je omezen Rayleighovou podmínkou:

$$Q_R = 8\pi(\varepsilon\delta r^3)^{\frac{1}{2}} \quad [5] \quad (5)$$

V případě, že platí $|Q| > Q_R$, dojde k deformaci kapky a následné „explozi“ na několik menších, působením coulombické repulzní síly kladného náboje, který byl kumulován na povrchu. Vzhledem k odpařování rozpouštědla se tento proces několikrát opakuje [5].

1.2.3.2 Vznik Taylorova kužele

Deformace relativně malých kapiček v důsledku přiložení elektrického pole je velmi dobře známá. Účinek klesá s rostoucím průměrem kapky. Prodloužením kapky vzniká kuželovitý tvar a přímý proud kapaliny je vyražen z jeho vrcholu.



Obr. 4: (a) Taylorův kužel s přímým proudem vzniklý při elektrostatickém zvlákňování 10% hm. roztoku PLA v dichlormethanu při napětí 1,2kV/cm. (b) Větvení proudu polymeru. (c) Více vznikajících trysek z jediné kapky.[5]

Taylorův kužel vzniká při kritickém napětí, které působí na kapku.

$$U_C^2 = \left(\frac{2L}{h} \right)^2 \left(\ln \left(\frac{2h}{R} \right) - 1,5 \right) (0,117\pi RT) \quad [5] \quad (6)$$

kde (U_C) je napětí působící na kapku na konci kapiláry délky (h) a průměru (R). Pozorováním různých kapalin Taylor stanovil rovnováhu mezi povrchovým napětím a elektrostatickými silami, která odpovídá úhlu 49,38°. Tento úhel však může být různý pro různé roztoky nebo taveniny polymerů. Změna tvaru kapky do kuželovitého tvaru značí počátek působení extenzivní síly, která zahajuje tvorbu fibril, vedoucí k elektrostatickému zvlákňování [5].

Ovšem rovnice nepopisuje skutečnost zcela exaktně, protože neobsahuje parametry jako vodivost a viskozitu kapaliny, které tvoří kapku. V praxi mají oba tyto parametry velký vliv na formování Taylorova kužele a následný electrospinning.

1.2.3.3 Vznik trysky (launching of the jet)

Vzhledem k zapletení molekul polymeru v koncentrovaném roztoku, vnější síla působící na kapku jako coulombické odpuzování, nestačí k tomu, aby kapka explodovala. Dochází tedy ke zvětšení povrchu z důvodu akumulace náboje na povrchu trysky polymeru, tj. formování nanovláken. Vzniklé vlákno, které směřuje z Taylorova kužele směrem k uzemněnému kolektoru, tak vytvoří novou plochu, která je schopna kumulovat další náboje [7].

Trysku polymeru, za předpokladu zachování hmotnosti, lze popsat následovně:

$$posuv (feed rate) = \frac{(\pi d^2 \rho v)}{4} \quad [5] \quad (7)$$

kde d je průměr trysky a v je rychlost trysky polymeru.

Podobně při zachování náboje platí následující:

$$I = \pi d Q u + \frac{(k \pi d^2 E)}{4} \quad [5] \quad (8)$$

kde E je intenzita elektrického pole, I je proud tekoucí tryskou polymeru, k je bezrozměrná vodivost roztoku a Q je povrchový náboj [5].

1.2.3.4 Prodlužování přímého úseku (Elongation of Straight Segment)

K výtrysku proudu polymeru dochází téměř okamžitě po přiložení kritického napětí (U_C) na roztok polymeru. Coulombické repulzní síly povrchových nábojů trysky mají axiální složku, která prodlužuje proud polymeru směrem ke kolektoru. Bylo stanoveno, že rychlost proudu polymeru se zvětšuje se vzdáleností od Taylorova kužele. Výsledkem je zmenšení průměru, které je způsobené prodlužováním proudu polymeru a také vypařováním rozpouštědla. Se zužováním proudu roste jednotkový povrch materiálu, zatímco jednotkový povrchový náboj klesá. Ztráta povrchového náboje způsobená nabitými částicemi ve vzduchu je stále častější, a to z důvodu rostoucí plochy vlákna [5].

1.2.3.5 Oblast bičování (Whipping Instability Region)

Z počátku rovný, přímý proud polymeru se při cestě ke kolektoru stává nestabilním, což se projevuje vlnivými pohyby. Ohýbání proudu vede také ke zvětšení plochy, tím i k snížení hustoty povrchových nábojů. Teoretické studie elektricky nabitého proudu

polymeru stanovily bičovací oblast jako výsledek několika různých nestabilit (Raleighova, ohýbání, atd.). Typ nestability je dán velikostí intenzity elektrického pole, s rostoucí intenzitou dochází častěji k bičování (odpudivé síly nábojů v tomto případě nepůsobí převážně v axiálním směru).

Síly působící během bičování při elektrostatickém zvlákňování:

1. Gravitační síla (F_G) (působí směrem ke kolektoru u vertikálně uspořádaných apartur) $F_G = \rho \pi r^2 g$.
2. Elektrostatická síla (F_E), která prodlužuje proud polymeru a žene ho směrem k uzemněnému kolektoru. Síla je dána intenzitou elektrického pole a vlastnostmi materiálu.
3. Coulombické odpudivé síly (F_C) působící na povrchu proudu polymeru způsobují nestability a bičování. Velikost coulombických sil je ovlivněna vlastnostmi polymeru a rozpouštědla.
4. Viskoelastické síly, které působí proti prodloužení proudu polymeru v elektrickém poli. Jsou ovlivněny molekulární hmotností polymeru, typem polymeru a rozpouštědla.
5. Povrchové napětí působící proti natahování proudu polymeru. Je závislé na typu rozpouštědla, polymeru a aditivech.
6. Třecí síly, působící mezi povrchem proudu a okolím (vzduchem nebo jiným médiem).

Součet těchto sil určuje průměr proudu polymeru. Některé z těchto sil se s časem velmi rychle mění (odpaření rozpouštědla a rozptýlení náboje), proto je velmi těžké kvantitativně popsat celý vývoj [5].

1.2.3.6 Tuhnutí nanovláken (Solidification into Nanofiber)

Délku trvání bičování ovlivňuje především rychlost odpařování rozpouštědla. Nestálost (těkavost) rozpouštědla také velice výrazně ovlivňuje průměr vyrobených vláken. U vysoce těkavých rozpouštědel elongační viskozita dosáhne tak vysoké úrovně, že se již nebude uplatňovat bičování - vznikají vlákna s větším průměrem. Vlákna, získaná za ideálních podmínek, mají obvykle kruhový průřez - jsou kontinuální a nemají „korálky“ [5].

1.2.4 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování

K elektrostatickému zvlákňování polymeru je nutné, aby byl v kapalně formě (roztoku, nebo tavenině). Vlastnosti roztoku hrají jednu z klíčových rolí v procesu elektrostatického zvlákňování a mají zásadní vliv na výslednou morfologii vláken. Mezi nejdůležitější vlastnosti roztoku patří vodivost, povrchové napětí a viskozita [7].

1.2.4.1 Povrchové napětí

Povrchové napětí roztoku polymeru ovlivňuje velikost elektrického napětí, potřebného k elektrostatickému zvlákňování. Elektrické napětí, které působí proti povrchovému napětí a prodlužuje proud polymeru směrem ke kolektoru musí být větší, než povrchové napětí. V případě vysokého povrchového napětí může dojít k přerušení proudu polymeru a tvorbě kapek, což je nežádoucí – dochází k tzv. elektrosprayingu. Povrchové napětí je ovlivňováno typem polymeru a použitého rozpouštědla [7].

1.2.4.2 Rozpustnost polymeru

Přesto, že lze elektrostatické zvlákňování provádět také z polymerní taveniny, mnohem častější je použití roztoku polymeru. Ideální rozpouštědlo je schopno dobře rozpustit polymer a připravený roztok lze elektrostaticky zvláknit. Chování polymeru v rozpouštědle má velký vliv na vlastnosti vyráběných vláken.

Existují dva stupně rozpouštění polymeru. V první fázi molekuly rozpouštědla pronikají mezi molekuly polymeru a dochází k bobtnání polymeru. Pokud jsou intermolekulární síly mezi molekulami polymeru dostatečně silné (díky zesíťování, krystalinitě nebo vodíkovým můstkům), nedochází ke štěpení těchto vazeb. Druhá fáze rozpouštění proběhne pouze, pokud jsou intermolekulární síly mezi rozpouštědlem a polymerem dostatečné k rozštěpení vazeb mezi řetězci polymeru, poté vzniká skutečný roztok [7].

1.2.4.3 Viskozita

Viskozita roztoku má zásadní vliv na průběh elektrostatického zvlákňování a také na morfologii vyrobených vláken. Obecně platí, že viskozita roztoku je závislá na stupni zapletení polymerních řetězců. V případě příliš nízké viskozity roztoku dochází k elektrosprayingu a vznikají polymerní částice místo nanovláken. Obvykle s klesající viskozitou klesá také zapletení polymerních řetězců a vzrůstá pravděpodobnost vzniku „korálků“ na vláknech [7].

1.2.4.4 Těkavost rozpouštědla

Při elektrostatickém zvlákňování dochází k odpařování rozpouštědla během pohybu proudu polymeru směrem ke kolektoru. Je-li většina rozpouštědla odpařena již při kontaktu proudu polymeru s kolektorem, vznikají jednotlivá nanovlákná. Není-li rychlost odpařování dostatečná, může se místo vláken tvořit tenký polymerní film, což je nežádoucí. Těkavost rozpouštědla ovlivňuje řada faktorů, mezi nimi např. tenze par, bod varu, měrné teplo a další [7].

1.2.4.5 Vodivost roztoku

Aby došlo k elektrostatickému zvlákňování, musí být kapka polymeru dostatečně nabitá, aby odpuzivé coulombické síly překonaly povrchové napětí kapaliny. Prodlužování polymeru je závislé na schopnosti roztoku přijímat elektrické náboje [7].

1.2.5 Procesní parametry

Dalšími důležitými parametry, které ovlivňují elektrostatické zvlákňování, jsou vnější faktory, které působí na proud polymeru. Mezi ně patří použité napětí, rychlost toku polymeru, teplota, typ kolektoru, průměr jehly a vzdálenost kolektoru [7].

1.2.5.1 Aplikované napětí

Působení vysokého napětí je nejdůležitějším prvkem celého procesu elektrostatického zvlákňování. Vysoké napětí umožní nabít polymeru a iniciuje vznik trysky polymeru v případě, že elektrické síly překonají síly povrchového napětí. Obecně lze použitím napětí vyššího než 6 kV (jak kladného tak záporného) vytvořit Taylorův kužel na hrotu jehly a zahájit elektrospinning. Velikost napětí je závislá na rychlosti toku roztoku polymeru, napětí musí být dostatečně vysoké, aby došlo k vytvoření stabilního Taylorova kužele. S rostoucím napětím se zrychluje nabíjení polymeru na konci jehly, což způsobuje urychlení proudu polymeru a vyšší objemovou rychlost polymeru vycházejícího z jehly. Elektrostatické zvlákňování mohou ovlivnit také vnější podmínky jako je vlhkost, typ atmosféry a případně okolní tlak [7].

1.2.5.2 Rychlost toku polymeru

Rychlost toku polymeru určuje množství polymeru dostupné k elektrospinningu. Pro konkrétní napětí je dána rychlost, při které vzniká stabilní Taylorův kužel.

Se zvyšujícím se tokem polymeru se zvyšuje průměr vláken, nebo dochází k tvorbě korálků [7].

1.2.5.3 Teplota

Teplota roztoku ovlivňuje jak rychlost odpařování rozpouštědla, tak viskozitu roztoku. S rostoucí teplotou roste pohyblivost molekul polymeru, což umožňuje coulombickým silám polymer více prodlužovat. V případě, že jsou ve zvlákňovaném roztoku přítomny biologicky aktivní látky (enzymy, proteiny), může dojít ke ztrátě jejich funkčnosti vlivem zvýšené teploty [7].

1.2.5.4 Vliv kolektoru

Aby bylo možné uskutečnit elektrostatické zvlákňování, musí být mezi jehlou a kolektorem elektrické pole. Proto je ve většině aparatur použit vodivý kolektor (nejčastěji kovová deska), který je elektricky uzemněn. Pak vznikne mezi elektrodou a kolektorem stabilní elektrický potenciál. Morfologie struktury je také ovlivněna tvarem kolektoru.

Vzdálenost a geometrie kolektoru má vliv na dobu letu trysky polymeru a na sílu elektrického pole. S klesající vzdáleností má tryska polymeru méně času na odpaření rozpouštědla, vzrůstá intenzita elektrického pole. Při malých vzdálenostech dochází ke vzniku spojitých filmů místo nanovláknenného materiálu [7].

1.2.5.5 Průměr jehly

Menší vnitřní průměr jehly nebo ústí skleněné pipety snižuje ucpávání, průměr vláken a tvorbu korálků vznikajících na vláknech. Zamezení ucpávání je dáno menším kontaktem polymeru s atmosférou při nižších průměrech [7].

1.2.6 Modifikace elektrostatického zvlákňování

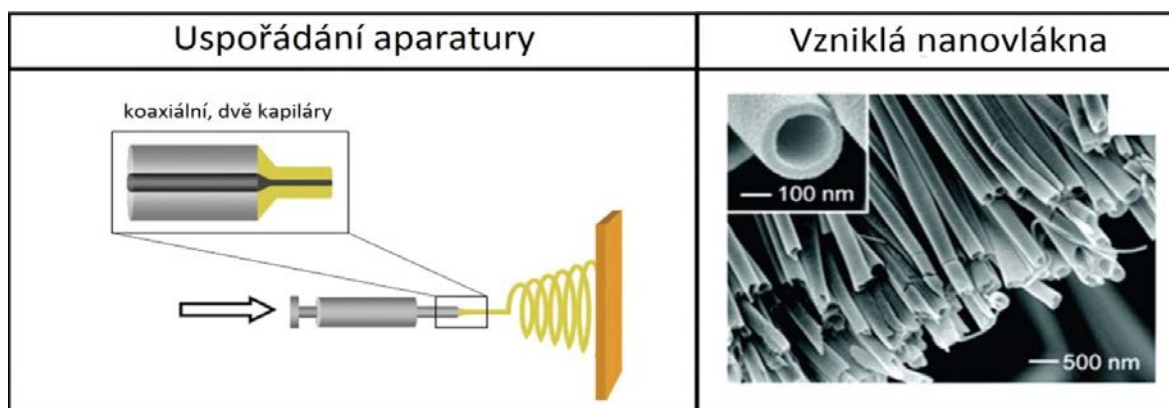
Modifikací základního uspořádání elektrostatického zvlákňování přináší široké možnosti pro výrobu nových typů nanovláken a materiálů. Existuje mnoho zajímavých uspořádání jako například: nové uspořádání elektrod, použití střídavého napětí, návrh vibračního hrotu, neobvyklé tvary kolektorů, unikátní návrhy tyček a použití různých atmosfér jako prostředí. Ovšem většina takových schémat slouží především pro lepší pochopení procesu elektrostatického zvlákňování a zůstávají pouze laboratorními unikáty. Několik nových návrhů aparatur se ovšem zdá být vhodným rozšířením pro výrobu nových

nanovláknenných materiálů. Vzniklé materiály mají neobvyklou morfologii jednak samotných nanovláken, ale i komplexní struktury [5].

1.2.6.1 Core-shell nanovláknna

Core-shell nanovláknna jsou bikomponentní nanovláknna, kde jádro je tvořeno jedním typem polymeru, které je obaleno jiným polymerem. Potenciální využití těchto nanovláken by mělo být v řízeném uvolňování léčiv, nanoelektronice apod.

Výroba těchto nanovláken se provádí pomocí koaxiálního elektrostatického zvlákňování – dva navzájem nezávislé polymerní roztoky jsou dávkovány do soustředných kapilár (jehel), plášť polymeru je veden v prstencovém prostoru mezi kapilárami a tekutiny jsou v kontaktu pouze na špičce koaxiální kapiláry. Složený proud polymeru je tvořen současně z vnitřního i vnějšího menisku [5] [10] [11].

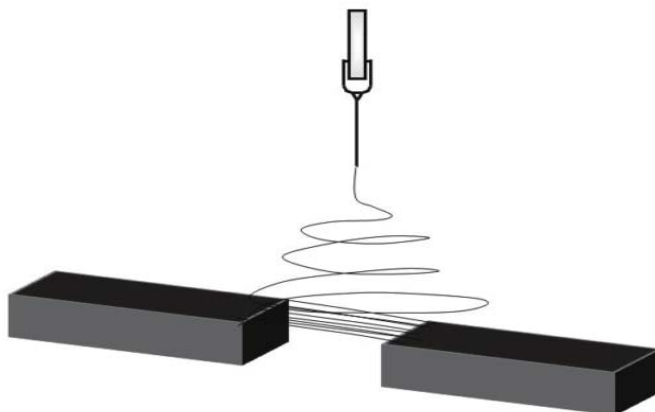


Obr. 5: Koaxiální uspořádání aparatury pro elektrostatické zvlákňování [11]

1.2.6.2 Vysoce uspořádané nanovláknenné struktury

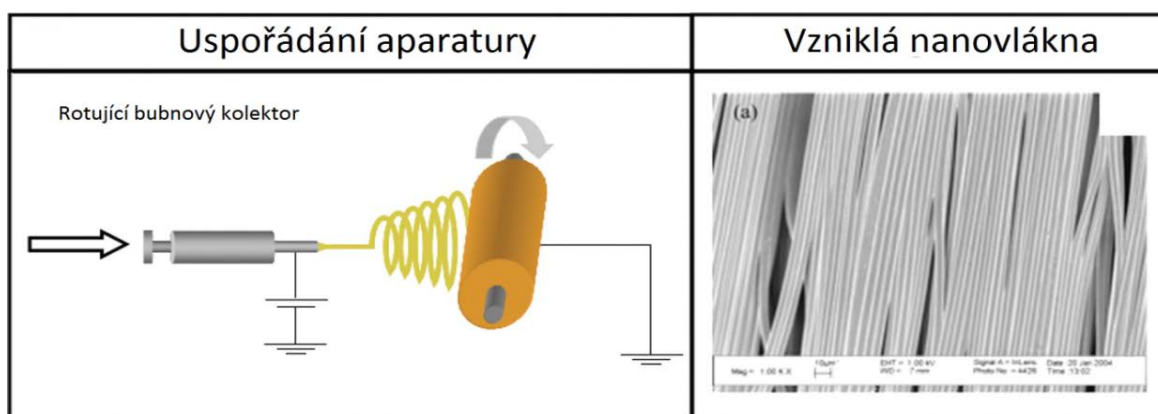
Chaotické pohyby trysky polymeru během letu ke kolektoru obvykle vedou k náhodně uspořádaným strukturám. V mnoha aplikacích jsou ovšem žádoucí vysoce orientované struktury, případně vícevrstvé materiály, kde jednotlivé vrstvy mají různou orientaci. Orientace nanovláken také přispívá k lepším mechanickým vlastnostem materiálu.

Jedním ze způsobů výroby orientovaných struktur je použití paralelních elektrod na nevodivém substrátu viz obr. 6.



Obr. 6: Narovnávání nabitého segmentu polymerního proudu přes dvojici paralelních elektrod [13]

Nejoblíbenějším způsobem k získávání orientovaných nanovláknenných materiálů je použití rotujícího válcového nebo bubnového kolektoru (obr. 7). Bičující proud polymeru se díky elektrostatickým silám přichytí k rotujícímu kolektoru, což vede k narovnání koncové části segmentu [5] [10] [11].



Obr. 7: Schéma uspořádání s rotujícím válcovým kolektorem [11]

Jiným způsobem uspořádání je použití kovové tyčinky jako spinneru místo jehly. Tímto způsobem lze zvýšit koncentraci nábojů v kapce polymeru umístěné na hrotu tyčky a po překonání přitažlivých sil dojde ke vzniku trysky polymeru. K získání nanovláken je nutné, aby vzdálenost mezi hrotem tyčky a kolektorem byla větší než 1 cm. Výhodou tohoto uspořádání je, že nedochází k ucpávání jehly. Potřebný objem roztoku polymeru k elektrostatickému zvlákňování je velmi malý. Nevýhodou je krátká doba zvlákňování (5 až 10 s). To je způsobeno vystavením polymeru okolní atmosféře na hrotu tyčky, což vede k jeho tunutí a snížení množství vyráběného materiálu [5].

Podobným uspořádáním je také elektrostatické zvlákňování za pomoci mikroelektrod. Vysoká nábojová hustota je generována přímo elektrodou, vzniká tryska polymeru, která směřuje k opačně nabitě elektrodě. Potenciální využití tohoto uspořádání

je v elektronice především k propojování mikročipů. Nevýhodou je nestálý průměr vlákna po celé jeho délce, což může výrazně snížit množství aplikací [5].

Odlišným způsobem uspořádání aparatury je elektrostatické zvlákňování z válečku (nanospider). Princip této metody je založen na rotujícím válečku v roztoku polymeru, na jehož povrchu se tvoří tenký polymerní film. V nejkratší vzdálenosti mezi válečkem a elektrodou (největší intenzita elektrického pole) dochází k vzniku Taylorových kuželů a následnému elektrostatickému zvlákňování. Hlavním přínosem této metody je umožnění průmyslové výroby nanovláknenných materiálů se širokým praktickým využitím [12]. Tato metoda je světovým patentem Technické univerzity v Liberci a firmy Elmarco s.r.o.

1.2.7 Charakterizace různých nanovláknenných struktur polymerů

Nanovláknenné struktury vyrobené elektrostatickým zvlákňováním mají mnoho potenciálních aplikací v mnoha odvětvích, například: v bioinženýrství a životním prostředí, energetice, elektronice, armádě nebo bezpečnosti. Popis specifických vlastností nanovláknenných materiálů lze rozdělit do tří kategorií: popis morfologie, molekulární struktury a mechanických vlastností [7].

1.2.7.1 Morfologie

Morfologie jednotlivých vláken (průměr vlákna, velikost pórů na povrchu vlákna), stejně jako morfologie nanovláknenné membrány (jako pórovitost, orientace vláken) jsou základními vlastnostmi vyrobených struktur. Mezi morfologické vlastnosti patří také hydrofobní chování látek. Ke studiu morfologie polymerních nanovláken se nejčastěji používá skenovací a transmisní elektronové mikroskopie [13] [14][15][16].

Velikosti pórů a pórovitost nanovláknenných membrán patří k velmi důležitým charakteristikám a mají významný vliv na využití v praktických aplikacích (např. absorpce, filtrace, tkáňové inženýrství, katalýza). K návrhu materiálů pro tyto aplikace je nezbytné určit velikost pórů a jejich distribuci. U elektrostaticky zvlákněných struktur lze identifikovat dva typy pórů. Jednak póry uvnitř a na povrchu vláken, jednak póry v nanovláknenné struktuře (mezi vlákny). K měření velikosti pórů se využívá skenovací a transmisní elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil [17]. Z nepřímých metod se nejčastěji využívá rtuťová porozimetrie [7] [13].

Hydrofilní či hydrofobní charakter nanovláknenných materiálů je také důležitou charakteristikou. K určení slouží měření kontaktního úhlu. Pro hydrofilní materiály je tento úhel malý, naopak pro hydrofobní materiály je velký [7].

1.2.7.2 Molekulární struktura

Molekulární struktura nanovláken a nanovláknenných membrán má vliv na optické, tepelné a mechanické vlastnosti materiálu. Pokud je povrch materiálů vyrobených elektrostatickým zvlákňováním, dále chemicky upraven, je důležité znát také novou chemickou strukturu upravené polymerní molekuly [7].

Studium krystalinity polymerních nanovláken se provádí pomocí rentgenové difrakce, diferenciální skenovací kalorimetrie [18] a transmisní elektronové mikroskopie. K určení struktury polymerů a mezimolekulárních interakcí se nejčastěji využívá infračervené spektroskopie [19] a nukleární magnetické rezonance [20].

1.2.7.3 Mechanické vlastnosti

Mechanická stabilita jednotlivých nanovláken i nanovláknenných membrán je podmínkou pro téměř všechny potenciální aplikace, proto je určení mechanických vlastností velmi důležité. K charakterizaci mechanických vlastností nanovláknenných materiálů se používá mnoho různých metod, mezi které patří: ohybové zkoušky, tahové zkoušky a měření rezonančních frekvencí. Tahové zkoušky principiálně kopírují tahové zkoušky běžných makromateriálů a představují nezbytný předpoklad k získání materiálových vlastností. Elastické vlastnosti nanovláknenných struktur se určují pomocí mikroskopie atomárních sil [7].

Při studiu mechanických vlastností bylo prokázáno, že u materiálů vyrobených s použitím uspořádání se statickým kolektorem, neexistuje anizotropie mechanických vlastností [7]. Naopak v [21] a [22] je prokázáno, že materiály vyrobené elektrostatickým zvlákňováním mají odlišné vlastnosti v různých směrech, pokud byly tyto struktury získány za použití rotačního kolektoru – vliv rychlosti rotace a dalších parametrů procesu.

1.3 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny (Wet Electrospinning)

Pod pojmem elektrostatické zvlákňování do kapaliny se rozumí použití lázně s vhodnou kapalinou jako kolektoru v kombinaci s elektrostatickým zvlákňováním. Návrh tohoto uspořádání vznikl kvůli obtížně kontrolovatelné tloušťce vyráběného materiálu u klasického elektrostatického zvlákňování, kdy lze velmi dobře ovládat pouze 2-D

strukturu vláken. Při snaze vyřešit tento problém za pomoci klasického elektrostatického zvlákňování bylo navrženo několik metod, například použití mikrovzorované formy jako kolektoru, použití mikročástice jako výplně mezi nanovláknky, použití chemických nadouvadel. Tyto metody mají však nevýhody, které omezují jejich praktické využití.

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny, resp. na povrch kapaliny se ukázalo jako vhodná metoda k přípravě nanovláknenných třídimenzionálních struktur, které nelze pomocí elektrostatického zvlákňování běžně vyrobit. Zásadní rozdíl oproti klasickému elektrospinningu je v použitém kolektoru. Kolektor je tvořen koagulační lázní s vhodnou kapalinou. Výběr vhodného koagulačního roztoku ovlivňuje výslednou morfologii, geometrii a průřez vznikajících vláken. Velikost povrchového napětí lázně kolektoru ovlivňuje, zda se vlákna budou schopna potopit do kapaliny či nikoliv, což ovlivňuje výslednou strukturu materiálu. Elektrostatické zvlákňování do kapaliny je blíže popsáno v[23].

Materiály vyrobené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny mají „houbovitý“ charakter a jejich objemová hustota je mnohem menší než u materiálů vyrobených standardním uspořádáním. Naproti tomu jejich pórovitost je mnohem větší. Změnu hustoty a pórovitosti materiálů lze snadno měnit pomocí vhodně zvolené lázně kolektoru (resp. povrchového napětí).

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny představuje novou cestu k návrhu biomimetických lešení pro podporu růstu buněk a tkání, nových sanačních technologií, elektronických zařízení a k mnohým dalším potenciálním aplikacím.

Tabulka 2: Přehled materiálů připravených elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny

| Polymer | Rozpouštědlo | Kapalina (kolektor) | Specifické uspořádání | Průměr vláken [nm] | Využití | Lit. |
|---|---|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------|------|
| celulóza + heparin | 1-butyl-3-methylimidazo- l chlorid | ethanol | iontové rozpouštědlo | 1 000 | obvazové materiály, antikolagencia | [25] |
| celulóza | 1-butyl-3-methylimidazo- l chlorid | destilovaná voda | zahřívání zásobního roztoku | 500 – 800 | ultrafiltrace, tkáňové inženýrství | [26] |
| chitin | 1,3-diethylimidazol acetát, 1-ethyl-3-methylimidazo- l acetát | destilovaná voda | iontové rozpouštědla | – | – | [27] |
| poly(ester-urethan) močovina | hexafluoroisopropanol | živný roztok | rotační, záporně nabitý kolektor | 1 500 | tkáňové inženýrství | [29] |
| polystyren | chloroform, N,N-dimethyl-formamid 1:1 | fluorinert FC 40 | spiner ponořen v kapalině | 10 000 | | [30] |
| kyselina polyglykolová | 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol | voda + butanol | – | 636 ± 234 | – | [33] |
| polyakrilonitril | dimethyl-formamid | polymethyl-methakrylát | napětí až 60 kV | 64 | elektronika | [34] |
| polystyren | chloroform | – | spiner ponořen v kapalině | – | – | [32] |
| polyethylimin + polyvinylalkohol | voda | glutaraldehyd + N,N-dimethyl-formamid | rotační válcový kolektor | 650 | sanační technologie | [35] |
| poly(trimethylen-karbonat-co-ε-kaprolakton)-blok-poly(p-dioxanon) | hexafluoroisopropanol | metanol | – | 2 300 ± 300 | regenerační medicína | [36] |
| polykaprolakton + kolagen | 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol | živný roztok, destilovaná voda | vícevrstvé struktury | – | tkáňové inženýrství | [37] |

1.3.1 Zvlákňování z iontových rozpouštědel

Speciálním případem využití metody wet-electrospinningu je příprava vláken z roztoků polymerů v iontových kapalinách [24]. Tohoto způsobu se využívá pro zvlákňování polymeru, z něhož nelze připravit roztoky v klasických rozpouštědlech a u něhož nelze ani provádět zvlákňování z taveniny (např. celulóza). Studium elektrostatického zvlákňování celulózy a jejích derivátů je zajímavé především kvůli biokompatibilním a biodegradačním vlastnostem připravených nanovláken a k jejich vysoké afinitě k biologickým materiálům.

Vlákna celulózy a kompozitní vlákna tvořená směsí celulóza-heparin byla připravena elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny z roztoku iontového rozpouštědla [25]. Ke zvlákňování byly použity 10% roztoky celulózy s přídavkem heparinu v iontovém rozpouštědle 1-butyl-3-methylimidazol chloridu. Objem zásobního roztoku byl 1 ml a výtoková rychlost polymeru byla 0,03 – 0,05 ml/h. Kladné napětí přiložené na jehlu se pohybovalo v rozmezí 15 – 20 kV, uzemněná lázeň kolektoru ve vzdálenosti 15 cm byla tvořena ethanolem s hliníkovou folií na dně bazénku.

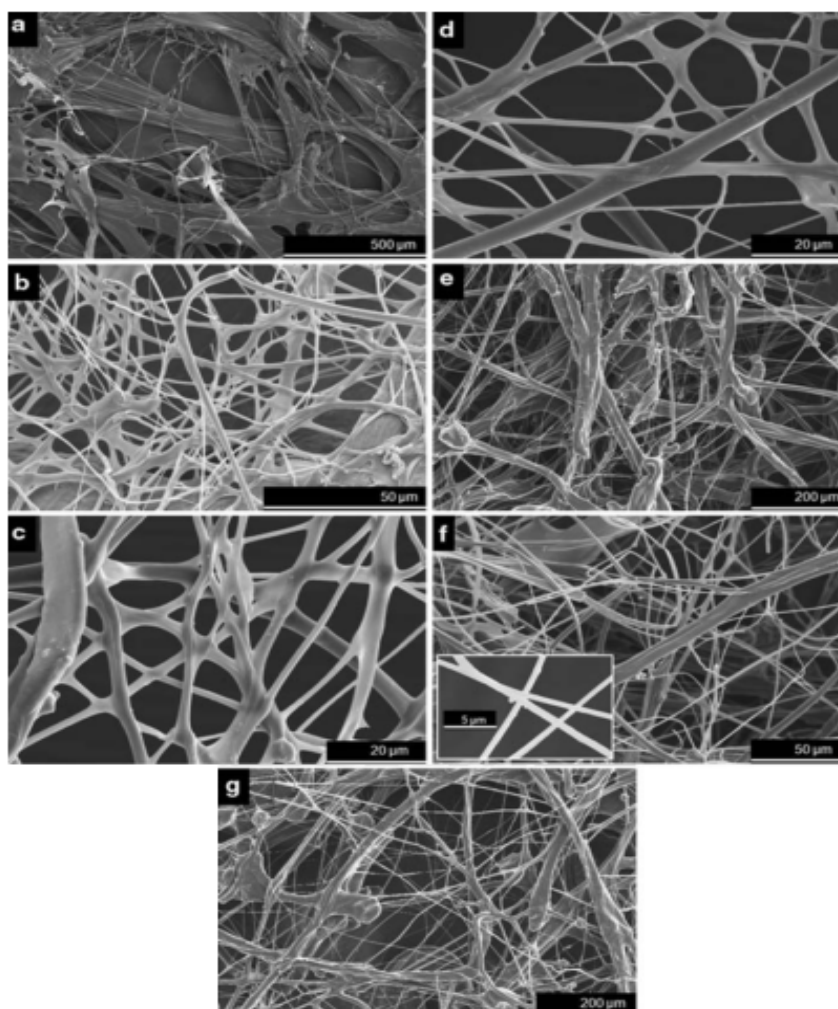
Pomocí analýzy elektronovým mikroskopem byl určen průměr vláken, který byl stanoven na 1 μm , větší průměr vláken je způsoben především vysokou viskozitou roztoku. Biologická aktivita byla zkoumána měřením rychlosti srážlivosti krve a ukázalo se, že s rostoucí koncentrací bikomponentních vláken celulóza-heparin se doba srážení výrazně prodlužuje, což je důkazem biologické aktivity vyrobeného materiálu i po aplikaci vysokého napětí. Bikomponentní vlákna celulóza-heparin jsou příslibem pro výrobu tkanin vhodných ke konstrukci cév s vynikající biologickou kompatibilitou. [25]

Tabulka 3: Srážecí kinetika lidské krve, kde R je doba srážení a K doba vytvoření sráženiny o velikosti 20 mm [25]

| Vlákna | R [min] | K [min] |
|--------------------------------|---------|---------|
| Lidská krev (kontrolní vzorek) | 3,8 | 2,6 |
| Celulóza | 4,8 | 1,6 |
| Celulóza-heparin (1 mg) | 24,0 | 16,1 |
| Celulóza-heparin (1,8 mg) | 69,4 | 43,3 |

Další příklad elektrostatického zvlákňování celulózy do kapaliny je v článku [26]. Ke zvlákňování zde byly použity roztoky celulózy s různou koncentrací v iontovém rozpouštědle (1-butyl-3-methylimidazol chlorid). Ke dvěma roztokům celulózy byl přidán

dimethylsulfoxid (DMSO) ke snížení viskozity a sledován vliv na morfologii vláken. Modifikací uspořádání elektrostatického zvlákňování do kapaliny bylo trvalé zahřívání zásobního roztoku polymeru na teplotu 100 °C. Kolektor tvořený demineralizovanou vodou byl umístěn ve vzdálenosti 15 cm od hrotu jehly, na kterou bylo přiloženo vysoké napětí 15 kV a rychlost zvlákňování byla určena volným pádem kapaliny v přítomnosti elektrického pole.



Obr. 8: Snímky SEM vláken celulózy připravených pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny při různých koncentracích celulózy. a) 1,5 % hm., b) 2,4 % hm., c) 3 % hm., d) 4 % hm., e) 5 % hm., f) 4% hm + DMSO, g) 5 % hm. + DMSO [26]

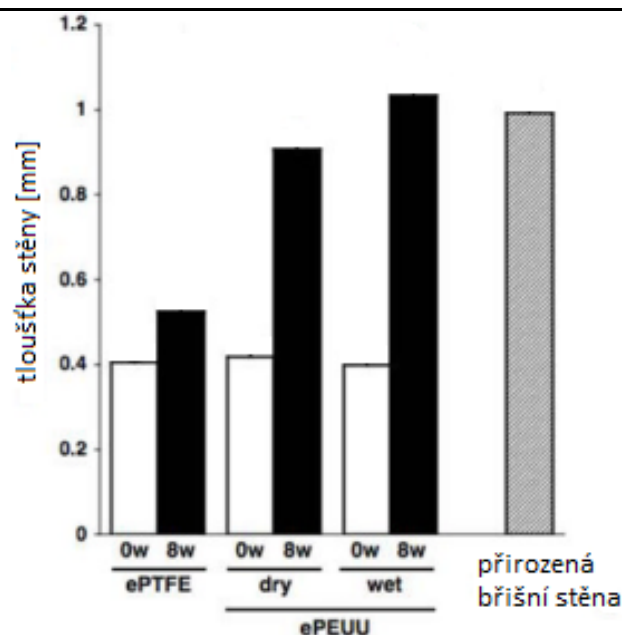
Na obr. 8, a) a b), je vidět formování shluků nanovláken při nízkých koncentracích celulózy, což je způsobeno vysokou rychlostí zvlákňování. S rostoucí koncentrací roztoku celulózy shluky mizí. Vlákná připravená z roztoku celulózy 4 % hm. mají nejmenší průměr (1 μm) ze všech roztoků bez DMSO. S přidáním DMSO došlo ke snížení viskozity a také průměru vláken na 500 – 800 nm. Z měření vyplývá, že morfologie vznikajících nanovláken je přímo ovlivněna koncentrací roztoku celulózy [26].

Chitinová nanovláknina byla připravena metodou elektrostatického zvlákňování do kapaliny z roztoku chitinu v iontových rozpouštědlech 1,3-dimethylimidazol acetátu a 1-ethyl-3-methylimidazol acetátu. Jako zdroj chitinu byly použity krunýře krabů a garnátů. Schránky korýšů byly nejprve rozemlety na částice < 125 nm a vzniklý materiál byl vysušen. Extrakce chitinu proběhla zahřátím v mikrovlnné troubě. Elektrostatické zvlákňování do kapaliny bylo prováděno se spotřebou 3 ml 2% roztoku chitinu, napětím 20 kV, rychlostí toku polymeru 0,5 ml/min a vzdáleností kolektoru 10 cm [27].

Ultrajemná vlákna tvořená z poly(m-fenyl isoftalamidu) byla též připravena z iontového rozpouštědla pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny viz článek [28].

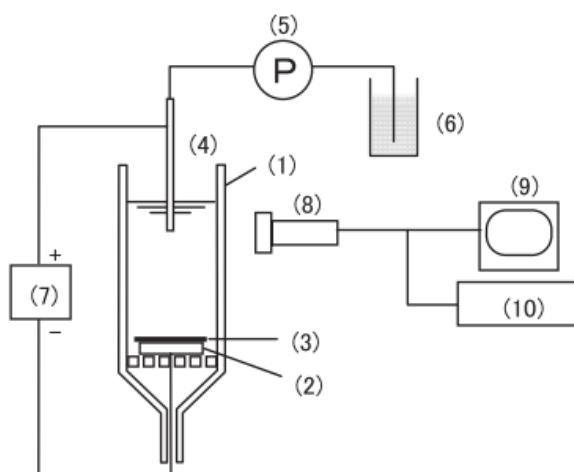
Bylo zkoumáno využití syntetických biodegradabilních nanovláknenných materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny k výrobě scaffoldů (lešení) k náhradě břišní tkáně [29]. Ke zvlákňování byl použit 12% roztok poly(ester-uretan)močoviny v hexafluoroisopropanolu s rychlostí toku 1,5 ml/h. Napětí přiložené na jehlu bylo 12 kV, rotační kolektor s rychlostí 250 rpm byl tvořen materiálem z buněčného séra (pro lepší infiltraci buněk), který byl připraven pomocí elektrosprayingu, roztokem buněčného séra na klasický kovový kolektor. Kolektor byl umístěn ve vzdálenosti 20 cm a byl připojen k zápornému napětí – 4 kV. Vyroběný materiál byl použit k náhradě břišní stěny potkanů. Bylo zjištěno odlišné chování materiálů připraveného elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny a vláken připravených klasickým elektrostatickým zvlákňováním. U vláken vyrobených elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny se projeví lepší léčebné účinky z důvodů podobnosti fyziologického a mechanického chování s přirozenou tkání (viz graf 1). Došlo k pronikání vnějších buněk do materiálu a k převzetí přirozených mechanických vlastností a anizotropie původní tkáně.

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny se proto jeví jako potenciálně vhodný proces k přípravě tkáňových lešení.



Graf 1: Tloušťka tkáňových štěpů při implantaci a po osmi týdnech kultivace in vivo [29]

Ověřením možnosti přípravy vláken elektrostatickým zvlákňováním přímo v kapalině se zabýval Egashihara a jeho spolupracovníci [30]. Metodu označují autoři jako wet-electrospinning. Vlákná byla připravována z roztoku polystyrenu v chloroformu, N,N-dimethylformamidu a jejich směsi. Jako vhodný roztok se ukázal pouze roztok polystyrenu v chloroformu. Jako izolantu a současně koagulantu bylo použito kapaliny na bázi fluorovaných uhlovodíků (Fluorinert FC-40). Zvlákňování bylo provedeno s různými koncentracemi roztoků polystyrenu (5, 15, 20 a 25 % hm.), přičemž vlákna vznikala pouze z roztoků o koncentraci 20 a 25 % hm. Průměr takto připravených vláken se pohyboval od 10 do 50 μm . Uspořádání aparatury je zřejmé z obr. 9.



Obr. 9: Schéma elektrostatického zvlákňování v kapalině. (1) skleněná nádoba, (2) záporná elektroda, (3) kovový kolektor, (4) jehla, (5) čerpadlo, (6) zásobní roztok, (7) stejnosměrný vysokonapěťový zdroj, (8) CCD kamera, (9) monitor, (10) DVD rekordér [30]

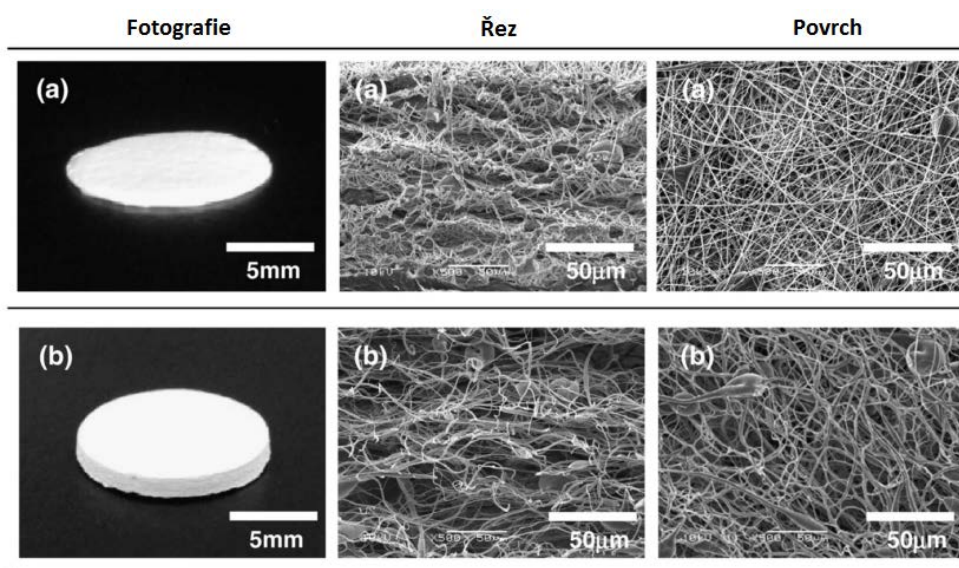
Řešení bylo patentováno v [32]. Výhody metody spatřují autoři zejména v zamezení zdravotních rizik – je vyloučena možnost expozice dýchacích cest inhalací nanovláken.

Elektrostatickým zvlákňováním v kapalině byla také připravena vlákna, obsahující fluorescenční barvivo rhodamin B [32]. Vlákna byla připravena z roztoku polystyrenu v chloroformu, byl sledován vliv koncentrace fluoroforu na průběh elektrostatického zvlákňování.

1.3.2 Zvlákňování z neiontových rozpouštědel

Tato práce se však především zaměřuje na elektrostatické zvlákňování do kapaliny z roztoků neiontových rozpouštědel.

Výroba tkáňových lešení pomocí wet elektrospinningu se zdá být jednou z potenciálních možností využití tohoto způsobu zvlákňování. Yokoyama a kol. [33] využili k přípravě nanovláknenných materiálů kyselinu polyglykolovou (PGA). Ke zvlákňování byl použit roztok PGA v 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolu s koncentrací 90 mg PGA/ml. Rychlost toku zásobního roztoku polymeru byla nastavena na 8ml/h a bylo přiloženo kladné napětí 25 kV. Vzdálenost jehly od kolektoru, který byl tvořen jednak kovovou destičkou (při elektrostatickém zvlákňování) a také lázní s vodou a s terc-butylakoholem byla 30 cm. Z obr. 10 lze pozorovat rozdíl mezi strukturou nanovláknenného materiálu připraveného s kovovým kolektorem a materiálu vyrobeného elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny.



Obr. 10 :Fotografie a snímky ze SEM netkaných materiálů, vyrobených za a) elektrostatickým zvlákňováním s kovovým kolektorem, b) elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny [33]

Materiál vyrobený elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny má „houbovitý“ charakter, jeho struktura je nadýchanější – má větší velikost pórů, což způsobuje menší zdánlivou hustotu tohoto materiálu viz tabulka 4.

Tabulka 4: Srovnání zdánlivé hustoty a pórovitosti nanovláknenných struktur [33]

| Typ vlákna | Zdánlivá hustota [mg/cm ³] | Pórovitost [%] |
|-----------------------|--|----------------|
| PGA (kovový kolektor) | 223,3±16,2 | 85,3±1,1 |
| PGA do vody | 124,4±10,4 | 91,8±0,7 |
| PGA do 50% t-BuOH | 50,8±2,4 | 96,6±0,2 |
| PGA do 99% t-BuOH | 49,6±1,7 | 96,7±0,1 |

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny se ukázalo jako vhodné k výrobě materiálů, u kterých je nutné řídit jejich tloušťku [33].

Pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny lze připravit i vodivé nanovláknenné materiály. Přípravou nanovláken s nanočásticemi mědi se zabýval Ashraf [34]. Ke zvlákňování byly použity roztoky polyakrilonitrilu v dimethylformamidu s různými koncentracemi měděných nanočástic (0,2 – 1 % hm.). Vzdálenost kolektoru tvořeného polymethylmetakrylátem od pipety s průměrem 1 mm se pohybovala od 1 do 7 cm. Bylo zjištěno, že se zvětšující vzdáleností kolektoru klesá průměr nanovláken viz tabulka 5, naopak s rostoucí koncentrací měděných nanočástic průměr vláken roste viz tabulka 6. Vyrobené membrány byly použity ke stavbě mikro elektronických komponentů (tranzistorů). Vodivost takto vyrobených vláken s koncentrací 1 % hm. měděných nanočástic byla naměřena $2,6 \cdot 10^4$ S/m.

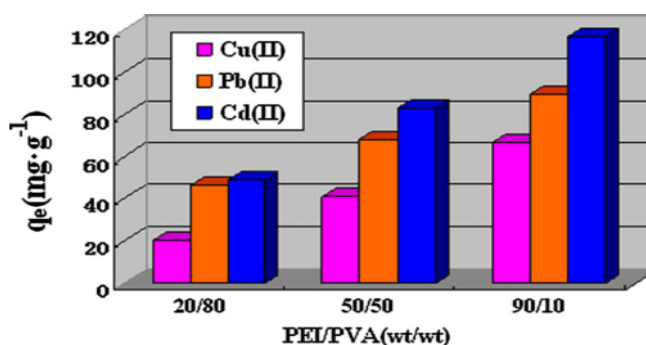
Tabulka 5: Vliv vzdálenosti kolektoru na průměr vláken [34]

| Vzdálenost jehla-kolektor [cm] | Průměr vláken [nm] |
|--------------------------------|--------------------|
| 1 | 102±32 |
| 3 | 96±24 |
| 5 | 80±20 |
| 7 | 64±6 |

Tabulka 6: Závislost průměru nanovláken na koncentraci měděných nanočástic [34]

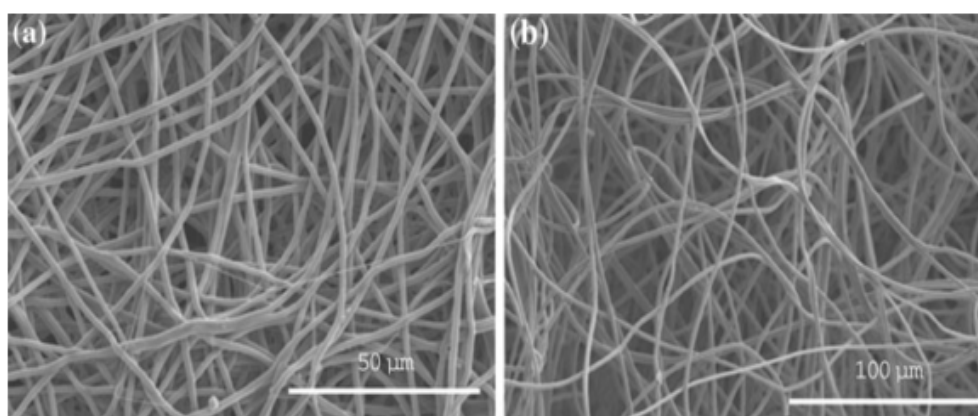
| Koncentrace měděných nanočástic [% hm.] | Vzdálenost kolektoru 1 cm | Vzdálenost kolektoru 7 cm |
|---|------------------------------|------------------------------|
| | Průměr vláken [nm] | Průměr vláken [nm] |
| 0 | 102±32 | 64±6 |
| 0,2 | 207±37 | 136±11 |
| 0,4 | 207±36 | 157±14 |
| 0,6 | 206±43 | 200±24 |
| 0,8 | 227±36 | 202±22 |
| 1,0 | 293±45 | 202±25 |

Elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny byly vyráběny nanovláknenné membrány k záchytu těžkých kovů z odpadních vod [35]. Zvlákňovaný roztok tvořil polyethylenimin (afinita k těžkým kovům) a polyvinylalkohol jako nosné médium. Koagulační lázeň kolektoru, vzdáleného 15 cm od spinneru, obsahovala síťující činidlo (glutaraldehyd) a také N,N-dimethylformamid jako srážedlo v poměru 1 : 20. Napětí nastavené při zvlákňování bylo 15 kV a rychlost výtoku polymeru z jehly byla 0,36 ml/h. Schopnosti záchytu těžkých kovů vyrobenými membránami byly testovány v závislosti na koncentraci polyvinylalkoholu a polyethyleniminu. Membrány byly umístěny na 24 hodin do vodných roztoků obsahující ionty Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} s koncentrací 100 mg/l. S rostoucí koncentrací polyethylininu roste schopnost absorpce viz graf 2. Elektrostatické zvlákňování do kapaliny představuje nový způsob výroby zesíťovaných nanovláknenných membrán, při jejichž výrobě probíhá síťování již během elektrostatického zvlákňování [35].



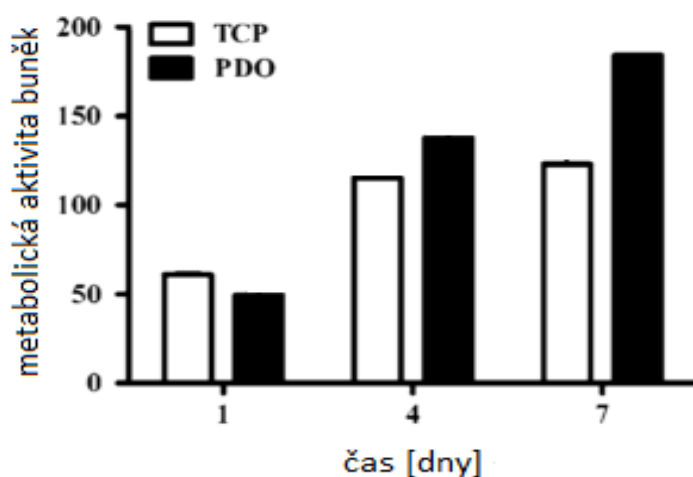
Graf 2: Závislost záchytu těžkých kovů na zastoupení polyethylenimidu v membráně [35]

Vývoj tkáňových scaffoldů pro regeneraci kostí pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny je popsán článku [36]. K výrobě třírozměrných scaffoldů byl použit 13% roztok poly(trimethylenkarbonat-co-ε-kaprolakton)-blok-poly(p-dioxanon) v hexafluoroisopropanolu, rychlost toku byla 0,7 ml/h. Nastavené napětí při zvlákňování bylo 13 kV, kolektor tvořen methanolem byl umístěn ve vzdálenosti 15 cm od hrotu kapiláry. Materiál, připravený elektrostatickým zvlákňováním, měl menší průměr vláken ($1,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$) a velmi vysokou zdánlivou hustotu, na rozdíl od materiálu vyrobeného elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny ($2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$) a zároveň nižší hustotu a vyšší pórovitost ($90 \pm 0,2 \%$), viz obr. 11.



Obr. 11: a) Materiál vyrobený elektrostatickým zvlákňováním na kovový kolektor, b) materiál vyrobený elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny [36]

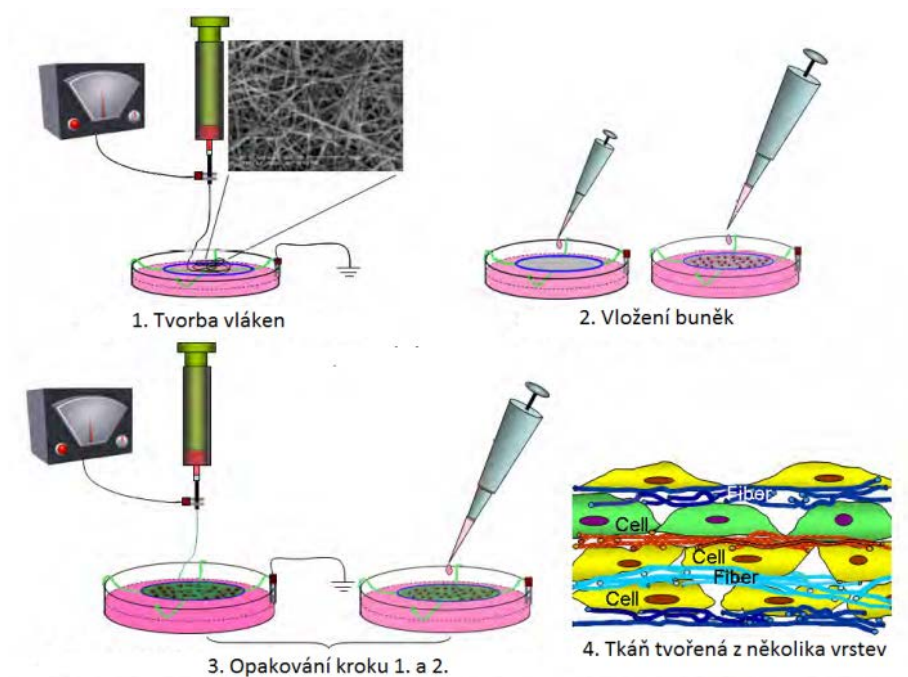
Na třírozměrném scaffoldu, vyrobeném elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny byl ověřen růst kostních buněk. Počet buněk po čtyřech resp. sedmi dnech byl 1,2 resp. 1,5 krát vyšší než počet buněk na živné půdě viz graf 3.



Graf 3: Závislost růstu buněk na čase [36]

Scaffold vyrobený elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny vykazuje vysokou úroveň životaschopnosti buněk, což je příslibem pro využití těchto materiálů ke kultivaci buněk a tkání v regenerativní medicíně [36].

Dalším způsobem přípravy tkáňového lešení je metoda vrstvení (layer by layer, LbL) [37]. Hlavní přínosem využití elektrostatického zvlákňování na povrch kapaliny u této metody je okamžitá hydratace vzniklých vláken, což vede k jejich stabilizaci, nedochází ke kontrakci vláken. Kolektor byl tvořen různými roztoky (živným roztokem, destilovanou vodou) a vždy byla vlákna úspěšně připravena, morfologie vláken zachycených na povrchu kapaliny byla velmi podobná jako při použití kovového kolektoru. Výhody metody LbL jsou především ve stejnoměrné distribuci buněk v materiálu a v možnosti volby složení jednotlivých vrstev. Tato nová metoda by měla být vhodná zejména k přípravě tkání s hierarchickou strukturou a ke studiu buněk *in vivo*.



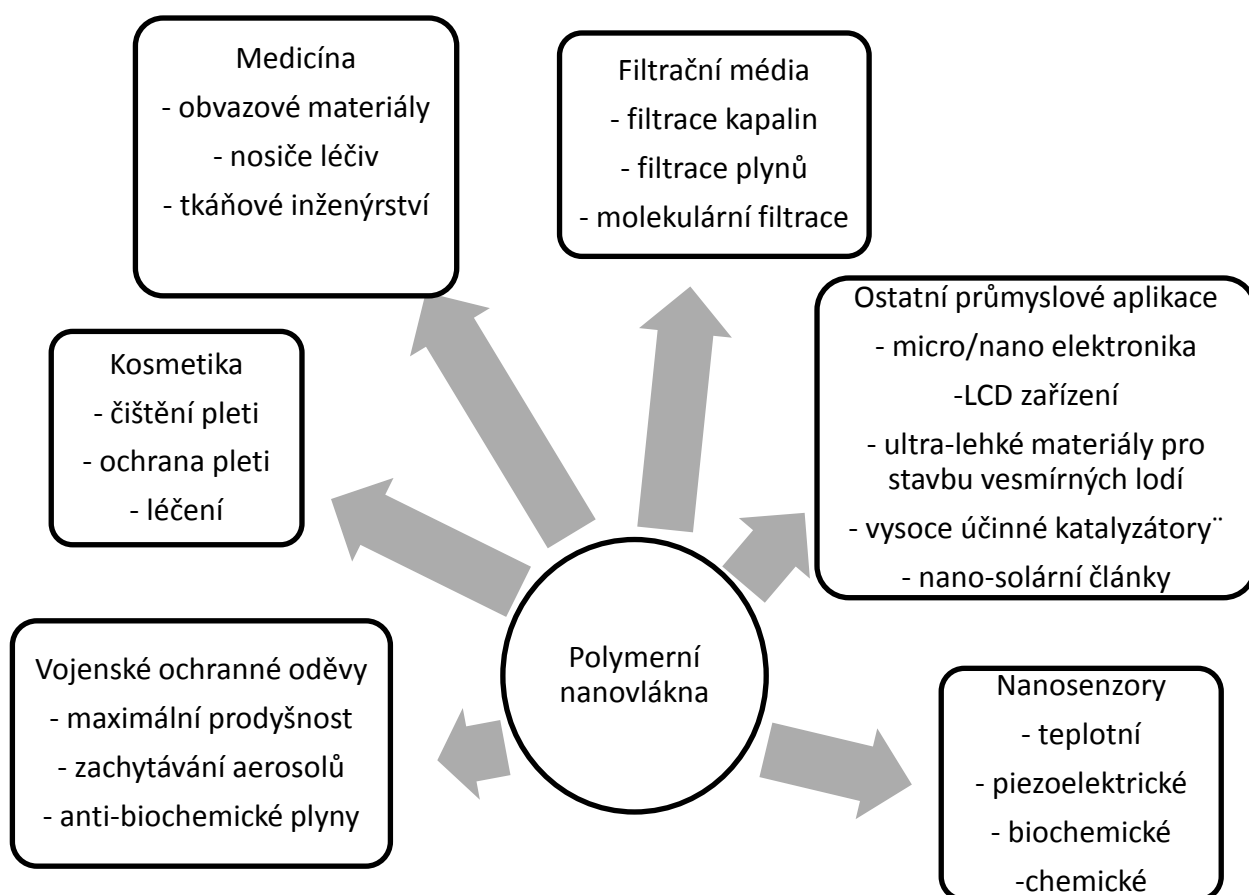
Obr. 12: Schéma přípravy vícevrstevných struktur [37]

Využití elektrostatického zvlákňování do kapaliny pro přípravu scaffoldů pro kostní buňky řešil Szpalski [38].

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny představuje novou cestu k návrhu biomimetických lešení pro podporu růstu buněk a tkání, nových sanačních technologií, elektronických zařízení a k mnohým potenciálním aplikacím.

1.4 Aplikace nanovláken

Publikací a patentů spojených s nanovláknem v průběhu posledních let velmi rychle přibývá. Velká většina těchto technologických patentů jsou americké patenty, z nichž dvě třetiny souvisí s biologickými a medicínskými aplikacemi. Druhou největší skupinou použití nanovláknenných materiálů tvoří filtrace. Následují další aplikace jako senzory, kompozity, katalyzátory a další (magneticky citlivá nanovláknena, elektronické aplikace-super kondenzátory založené na uhlíkových nanovláknenech a fotovoltaiické zařízení) [5].



Obr. 13: Přehled aplikací nanovláknenných materiálů [5]

1.4.1 Filtrace a ochranné materiály

Vzhledem k tomu, že účinnost filtrace je závislá na průměru vláken (roste s klesajícím průměrem) a vzhledem k velmi nízkému odporu nanovláknenných materiálů vůči proudu média se nabízí jejich použití pro filtraci plynů a kapalin.

Poptávka po lehkých, ochranných oděvech pro vojenské využití s vysokou prodyšností vlhkosti a plynů, schopných účinně filtrovat biologické částice ze vzduchu přispívá k rychlému rozvoji nanovláknenných materiálů. V neposlední řadě se vyvíjí nové

nanovláknenné materiály se specifickými reaktivními skupinami, které jsou schopny interakcí s chemickými sloučeninami ze vzduchu [5].

1.4.2 Nano-kompozity

V technologii polymerů je k vylepšení mechanických vlastností materiálů běžné použití různých výztuží, plniv a vláken v kombinaci s polymery. Konvenční vlákna, např. uhlíková, skleněná a aramidy, se běžně používají ve formě kompozitů na bázi širokého spektra polymerů. Zvýšení modulu pevnosti je velké i při velmi nízkých koncentracích plniv. Nanovláknna, která mají velmi vysoký specifický povrch, mají velmi dobré kompozitní vlastnosti [5].

1.4.3 Senzory

Nanovláknna jsou velice zajímavými materiály pro výrobu senzorů, a to především kvůli velkému specifickému povrchu, který jim umožňuje sorbovat nebo reagovat velmi rychle i při nízkých koncentracích látek v ovzduší. Příklady chemických senzorů založených na změně elektrického odporu byly také nedávno popsány v [39].

1.4.4 Biomedicínské aplikace

Pro využití nanotechnologií v medicíně je prozkoumáváno a vyvíjeno široké spektrum aplikací [40].

V poslední době je výzkum zaměřen mj. na trojrozměrné nanovláknenné lešení pro tkáňové inženýrství a návrh nanovláknenných matic pro cílený a kontrolovaný přenos léčiv. Úspěch polymerních nanovláknenných materiálů v nosných tkáňových aplikacích je dán především tím, že jejich struktura a velikost vláken odpovídá tělním tkáním. Hlavní předností je jejich vysoká pórovitost a snadná chemická povrchová úprava [5].

Tkáňové inženýrství je rychle rostoucí vědeckou oblastí, která je schopná vytvářet, opravovat a nahrazovat tkáň a orgány za pomoci kultivace buněk, tkání, orgánů a biologicky aktivních molekul. Cílem tkáňového inženýrství je vytvářet tkáň, které by dokázaly nahradit tkáň těla vlastní [41].

Běžná strategie v tkáňovém inženýrství představuje izolování specifických buněk pomocí biopsie od pacienta, jejich vypěstování na biomimetických scaffoldech v řízených kultivačních podmínkách, přenesení vzniklé konstrukce na požadované místo v pacientově těle a následné řízené formování tkáň. Většina používaných technik v tkáňovém

inženýrství je založena na použití makrostrukturálních, porézních scaffoldů, které slouží jako podpora pro upevnění první buňky a následně i tkáně jak in vitro, tak in vivo. Je nutné vědět, že požadavky na scaffoldy jsou různé vzhledem k jedinečným tělním tkáním. Tento způsob je vhodný především k výrobě relativně jednoduchých konstrukcí a je založen na přirozené schopnosti buněk a tkání se reprodukovat. Nicméně tato přirozená schopnost má svá omezení, což je důvodem, proč tkáňové inženýrství nebylo schopno vytvořit homogenní tkáň [41].

Jedním z hlavních problémů současných scaffoldů používaných v tkáňovém inženýrství je nehomogenní rozptyl živin a kyslíku ve struktuře, což výrazně snižuje její životaschopnost. K vývoji nových typů scaffoldů výrazně přispěl technický rozvoj v oblastech mikro a nanotechnologií, a to jak z hlediska výrobních, tak analytických metod. Vývoj těchto oblastí umožňuje jemnější řízení architektury scaffoldů, což z nich dělá aktivní látky v procesu vývoje tkání na rozdíl od pouhé adheze a proliferace buněk [41].

Elektrostaticky zvlákněné nanostruktury díky své schopnosti napodobovat extracelulární matrix, a to jak v topologii, tak v chemických vlastnostech se stávají stále více používanými materiály v tkáňovém inženýrství. Pomocí elektrostatického zvláknování lze vytvářet scaffoldy s požadovanou velikostí póru, vláken a také jejich orientací, čímž lze ovlivňovat mechanické vlastnosti scaffoldu, které nejlépe vyhovují jeho aplikaci [38].

Důležitými parametry pro aplikace nanovláken jsou biologická kompatibilita a degradabilita materiálů. Přehled používaných biodegradabilních polymerů k výrobě scaffoldů pomocí elektrostatického zvláknování je uveden v [38] [42] [43].

Vzhledem k dobrým vlastnostem je často používaným polymerním materiálem ve tkáňovém inženýrství polykaprolakton nebo jeho kopolymery [44].

2 Experimentální část

Experimentální část práce se zaměřila na popis zařízení pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny, popis vlastního postupu výroby vlákenných materiálů a popis úvodního testování s ohledem na strukturu a možnou aplikaci jako scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Použité materiály (polymer, kapaliny tvořící kolektor) a metoda výroby byly zvoleny s ohledem na cíl použití výsledných vlákenných vzorků. Vybrané materiály splňují požadavky známé pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. Zařízení pro výrobu vzorků popsané níže je navrženo tak, aby bylo možné ho vyrobit a používat v čistých prostorech.

2.1 Použité materiály

- Polykaprolakton, $M_w=48\,000 - 90\,000$ g/mol, CAS: 24980-41-4, Sigma-Aldrich.
- Chloroform, CAS: 67-66-3, Penta
- Ethanol p.a., CAS: 111-42-2, Penta
- Fosfátový pufr s 0,15 M NaCl (Phosphate Buffered Saline), Lonza Walkersville
- EDTA-Trypsin, CAS: 9002-07-7, Sigma-Aldrich
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DNEM), Sigma-Aldrich
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazol bromid], CAS: 298-93-1, Sigma-Aldrich
- Isopropanol, CAS: 67-63-0
- Kyselina chlorovodíková, CAS: 7647-01-0 Penta
- Methanol, CAS: 67-56-1, Penta
- Propidium jodid (PI), CAS: 25535-16-4, Sigma-Aldrich
- Glutaraldehyd, CAS: 111-30-8, Sigma-Aldrich
- Destilovaná voda, TUL

2.2 Použité metody

2.2.1 Měření povrchového napětí

Měření povrchového napětí bylo provedeno za normálního tlaku při laboratorní teplotě bublinkovou metodou přenosným tenziometrem PocketDyne (Krüss, Hamburg, Německo). Pro každý vzorek byla provedena vždy tři měření za normálního tlaku a

laboratorní teploty. Výsledná hodnota povrchového napětí byla určena z průměru naměřených hodnot a byla vypočtena směrodatná odchylka.

2.2.2 Měření elektrické vodivosti

Měření elektrické vodivosti bylo provedeno pomocí přístroje Inolab GnInd 720 (WTW, Weilheim, Německo) za normálního tlaku a laboratorní teploty. Pro každý vzorek byla provedena vždy čtyři měření. Výsledná hodnota vodivosti byla určena z průměru naměřených hodnot a byla vypočtena směrodatná odchylka.

2.2.3 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny

V této kapitole bude podrobně popsán postup výroby vzorků pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny.

2.2.3.1 Příprava zásobního roztoku polymeru

Z PCL byl rozpouštěním ve směsi chloroformu a ethanolu (9 hm. dílů chloroformu 1 hm. díl ethanolu) připraven 15% hm. zásobní roztok PCL promícháváním za rychlosti 300 ot/min. po dobu 24 hodin za laboratorní teploty.

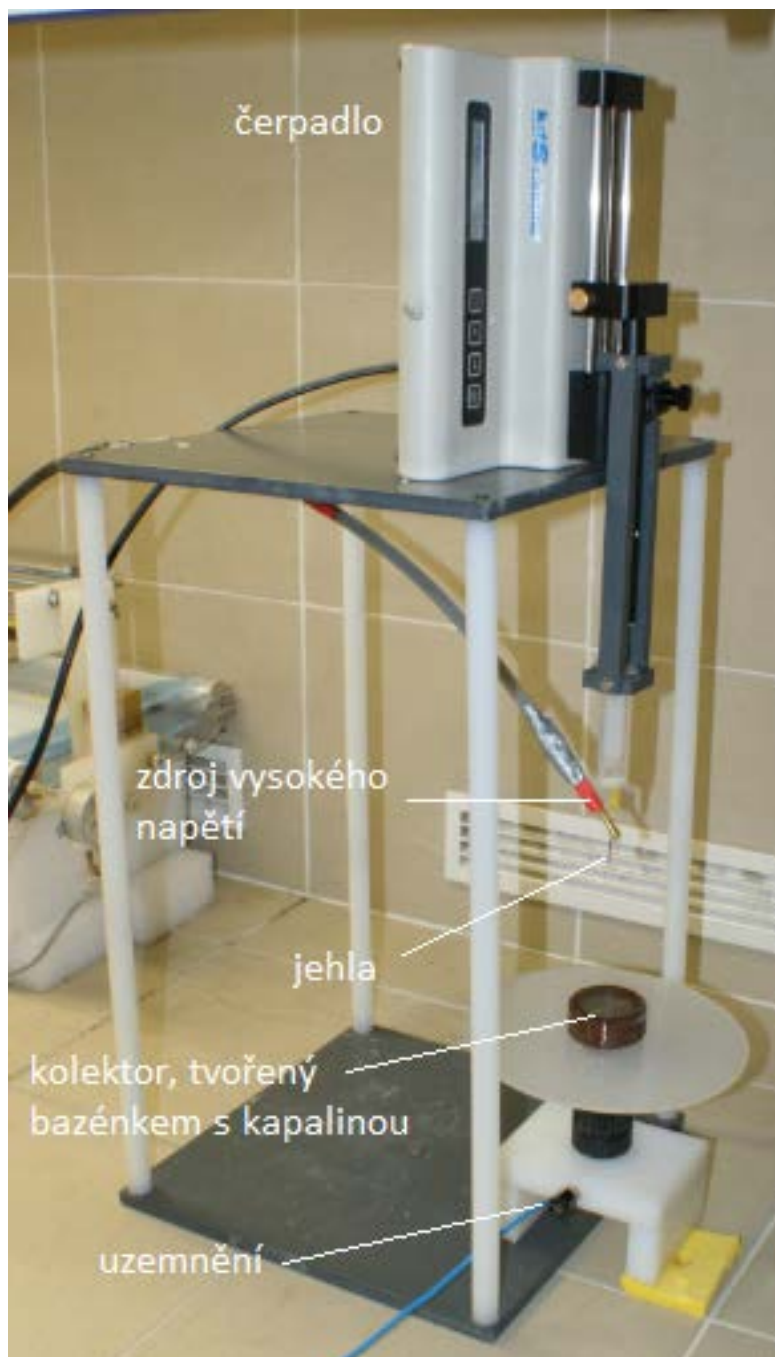
2.2.3.2 Příprava koagulačního roztoku (lázeň kolektoru)

Jako koagulační roztok (lázně kolektoru) byl použit ethanol, destilované vody a jejich směsi s obsahem 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % hm. ethanolu.

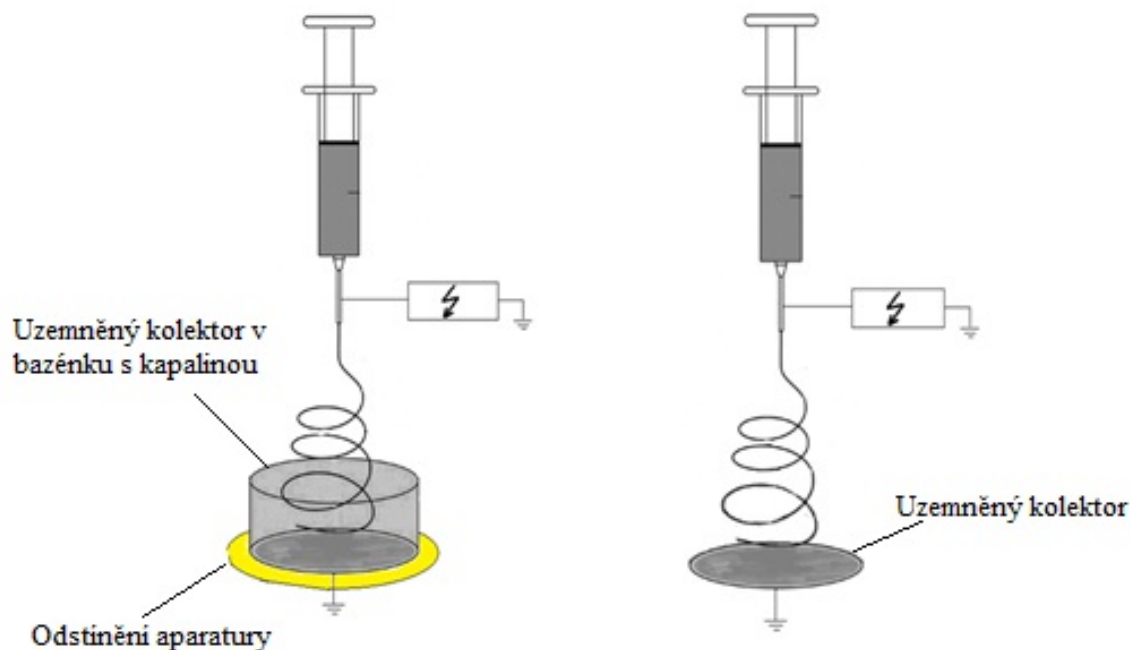
2.2.3.3 Aparatura

Na základě výsledků předběžných experimentů byla navržena a sestrojena aparatura pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny. Bylo použito dávkovací čerpadlo KDS-100 (KD Scientific, Holliston, USA), vysokonapěťový zdroj Spellman SL 150 (Spellman Highvoltage, New York, USA), stříkačka o objemu 10 ml s jehlou o průměru 0,9 mm. Jako nádoba pro lázeň kolektoru byly použity teflonové (PTFE) bazénky o vnitřním průměru 4 cm a různých hloubkách opatřené ve středu průchozím otvorem se závitem. Pod bazének byla umístěna kruhová destička s průchozím otvorem se závitem sloužící k odstínění kolektoru od zbytku aparatury. Stínící destička a kolektor byly našroubovány na ocelovou tyčku se závitem. Tato sestava kolektoru byla upevněna do stojánku se sklíčidlovou hlavou, což umožňovalo případně měnit vzdálenost mezi jehlou a kolektorem. Stojánek byl uzemněn. Na dno bazénku byla vložena nerezová destička o

průměru, odpovídajícímu vnitřnímu průměru bazénku, která byla prostřednictvím ocelové tyčky vodivě propojena s uzemněním. Dávkovací čerpadlo bylo umístěno na stojanu tak, aby vložená stříkačka s jehlou směřovala kolmo ke dnu kolektoru a do jeho středu. Vysoké napětí bylo přiloženo na jehlu pomocí vodiče s krokosvorkou. Aparatura byla umístěna v digestoři. Uspořádání aparatury je patrné z obr. 14.



Obr. 14: Uspořádání aparatury pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny



Obr. 15: Schéma aparatury pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny (vlevo) a schéma aparatury pro standardní elektrostatické zvlákňování (vpravo)

2.2.3.4 Experimentální podmínky

Zásobní roztok PCL byl dávkován čerpadlem rychlostí 7 ml/h, spotřeba na přípravu jednoho vzorku nanovlákněné struktury byla 0,5 ml. Vzdálenost ústí jehly ode dna bazénku byla 10 cm. Velikost kladného napětí přiloženého na jehlu byla 20 kV. Pro měření byly použity bazénky o vnitřních hloubkách 2,5; 5; 10 a 30 mm. Bazének byl naplněn koagulačním roztokem až po úplný okraj. Příprava třírozměrných, nanovlákněných struktur probíhala za laboratorních podmínek bez možnosti klimatizace ve zvlákňovacím prostoru. Sledována byla okolní teplota a vlhkost.

Pro získání srovnávacího materiálu bylo provedeno zvlákňování přímo na kovový kolektor (bez koagulační lázně, viz obr. 15) a ostatní experimentální podmínky byly shodné.

2.2.4 Charakterizace připravených nanovláken

Morfologie elektrostaticky zvlákněných vzorků byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Phenom (FEI Company, Hillsboro, USA). Před analýzou byly vzorky zvodivěny nazlacením v přístroji Quorum Q150RES (Quorum Technologies, Ashford, UK).

Pro snímky řezů byl materiál před zlacením zmražen za použití kapalného dusíku. Zmražená struktura byla následně rozlomena.

Vyhodnocení (obrazová analýza, měření průměrů vláken a jejich distribuce) bylo provedeno pomocí software Lucia G 4.82 (Laboratory Imaging, Praha).

2.2.5 Mikrobiologické testování in vitro

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit materiály potenciálně vhodné jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství. V této části budou popsány úvodní mikrobiologické testy prováděné na vybraných vyrobených vzorcích.

2.2.5.1 Příprava nanovláknenného materiálu

Z vyrobeného materiálu (PCL) byly připraveny vzorky odpovídající velikosti jamek kultivační destičky (kruhové vzorky o průměru 6 mm). Následně byl materiál sterilizován 70% ethanolem po dobu 30 minut. Poté byly vzorky přeneseny do sterilní 96-jamkové kultivační destičky a 2x promyty v PBS pro odstranění zbytku ethanolu. Na takto promyté vzorky bylo nasazeno 10^4 buněk ve 200 μ l kompletního média. PCL bez buněk (pouze v médiu) byl použit jako kontrolní materiál.

2.2.5.2 Příprava buněk

Buňky (3T3 myší fibroblasty, 10x pasážované) byly kultivovány v kultivačních lahvičkách v DMEM médiu obohaceném o 10% FBS a 1% směsi antibiotik. Po dosažení 80% konfluence bylo odsáto médium, buňky opláchnuty PBS a ztrypsinizovány po dobu 3 minut v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po oddělení buněk ode dna kultivační nádoby bylo přidáno médium a počet buněk byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. K pokusu bylo použito 10^4 buněk do každé testovací jamky 96-jamkové destičky.

2.2.5.3 MTT test buněk

Do nové sterilní 96-jamkové destičky se připraví 150 μ l kompletního média + 50 μ l MTT. Testovaný vzorek se přemístí do takto připraveného roztoku a ponechá se po dobu 4 hodin v termostatu (37 °C). Po inkubaci se odsaje médium a fialové krystaly formazanu se rozpustí přidáním 200 μ l IPA okyseleného HCl. Celý objem se přenesse do nové kultivační destičky a změří se absorbance (vlnové délky 570 a 650 nm) pomocí readeru BioTek ELx808 (BioTek, Winooski, USA). Analýza se provádí u 4 vzorků. Výsledná

absorbance se vypočítá jako rozdíl absorbance při 570 nm a při referenční vlnové délce 650 nm. Tato hodnota odpovídá počtu buněk na testovaném scaffoldu.

2.2.5.4 Fluorescenční mikroskopie

Vzorky byly jednou promyty v PBS a následně zafixovány ve zmrazeném methanolu po dobu 15 minut při 4 °C. Poté byly vzorky promyty PBS a obarveny propidium jodidem (PI). PI se váže na DNA, ve fluorescenčním mikroskopu lze tedy pozorovat buněčná jádra.

2.2.5.5 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky byly jednou promyty v PBS a následně zafixovány v roztoku 2,5% roztoku glutaraldehydu v PBS po dobu 15 minut při 4 °C. Poté byly vzorky odvodněny vzrůstající ethanolovou řadou (60, 70, 80, 90, 96 a 100%). Před analýzou byly vzorky vysušeny v termostatu, nazlaceny na přístroji Quorum Q150RES (Quorum Technologies, Ashford, UK) a pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Phenom (FEI Company, Hillsboro, USA).

3 Výsledky měření a diskuze

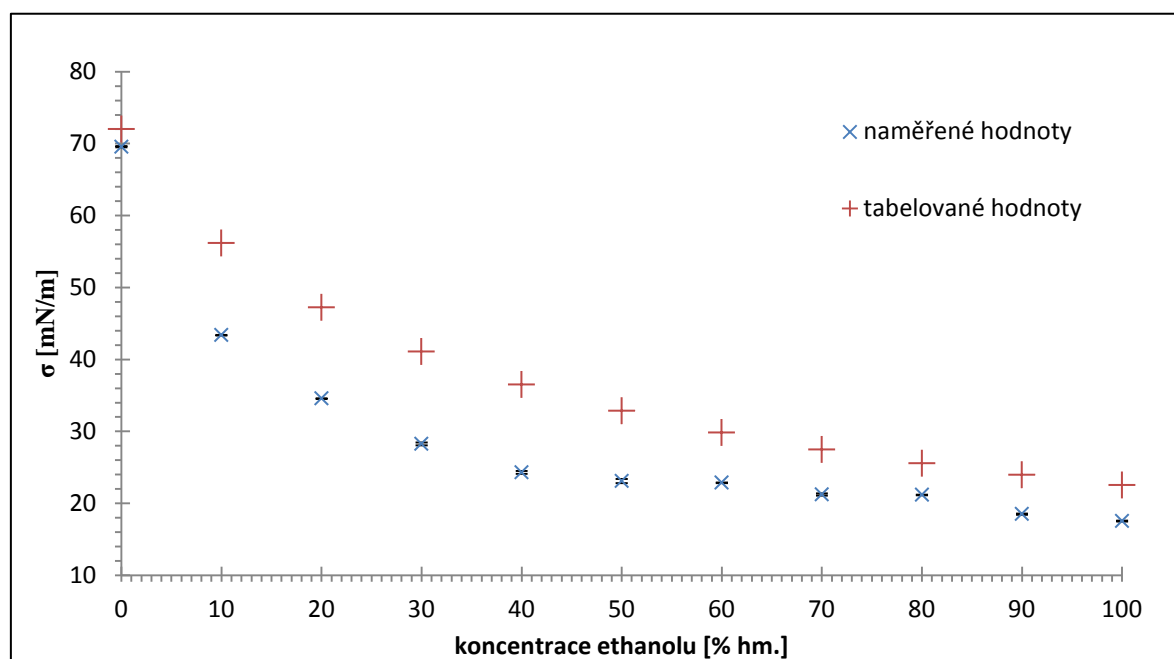
3.1 Povrchové napětí

Byla proměřena řada roztoků použitých jako koagulační lázeň. Výsledky měření viz tabulka 7 a graf 4.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty povrchového napětí roztoků tvořících kolektor

| Koncentrace ethanolu [% hm.] | Povrchové napětí naměřené [mN/m] | Teplota [°C] | Povrchové napětí tabelované (t=25°C) [mN/m] |
|------------------------------|----------------------------------|--------------|---|
| 0 | 69,57 ± 0,09 | 25,9 | 72,01 |
| 10 | 43,37 ± 0,05 | 24,5 | 56,18 |
| 20 | 34,57 ± 0,05 | 24,6 | 47,21 |
| 30 | 28,27 ± 0,21 | 24,5 | 41,09 |
| 40 | 24,30 ± 0,22 | 24,5 | 36,51 |
| 50 | 23,10 ± 0,29 | 24,4 | 32,86 |
| 60 | 22,87 ± 0,05 | 24,5 | 29,83 |
| 70 | 21,23 ± 0,17 | 24,4 | 27,48 |
| 80 | 21,17 ± 0,05 | 24,5 | 25,54 |
| 90 | 18,50 ± 0,08 | 24 | 23,93 |
| 100 | 17,53 ± 0,05 | 24,4 | 22,51 |

K přípravě koagulačních roztoků bylo použito ethanolu p.a. a „destilované“ (demineralizované) vody, což může být příčinou odchylek od tabelovaných hodnot [45]. Vliv povrchového napětí na výslednou morfologii připravených nanovláken je diskutován dále.



Graf 4: Srovnání naměřeného a tabelovaného povrchového napětí

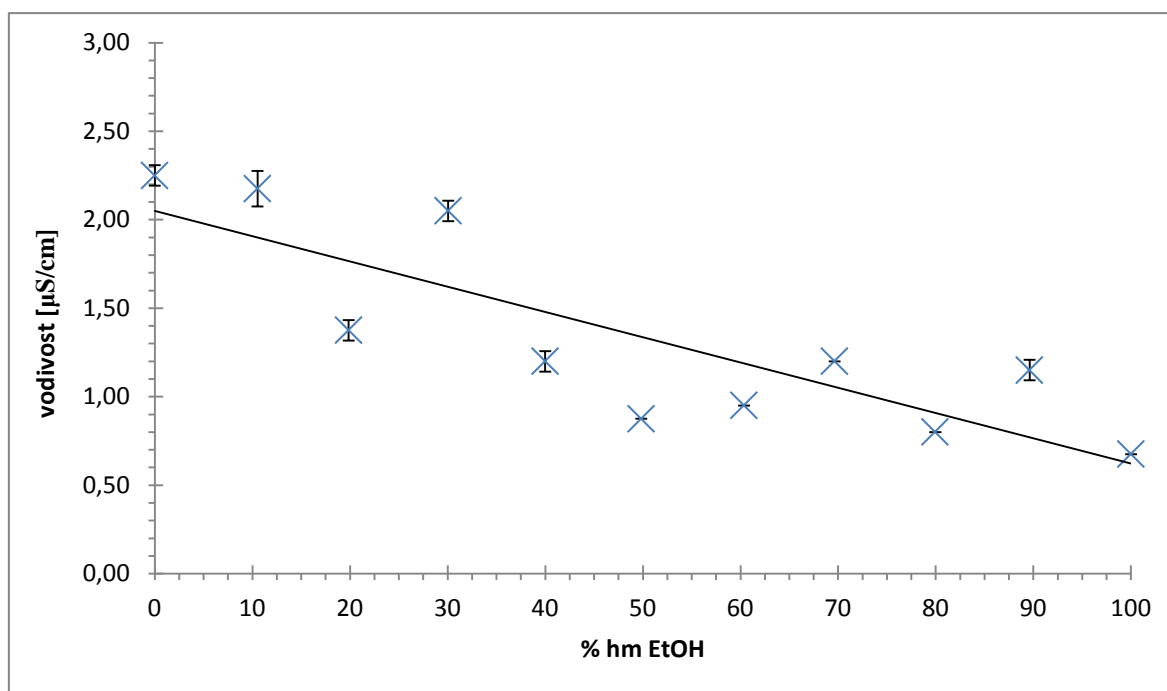
3.2 Elektrická vodivost

Byla změřena elektrická vodivost roztoků tvořících kolektor při elektrostatickém zvlákňování. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty elektrické vodivosti roztoků tvořících kolektor

| Koncentrace ethanolu [% hm.] | Elektrická vodivost [μS] | Teplota [$^{\circ}\text{C}$] |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 0 | $2,3 \pm 0,1$ | 22,2 |
| 10 | $2,2 \pm 0,1$ | 22,4 |
| 20 | $1,4 \pm 0,1$ | 22,3 |
| 30 | $2,1 \pm 0,1$ | 22,1 |
| 40 | $1,2 \pm 0,1$ | 22,1 |
| 50 | $0,9 \pm 0$ | 22,4 |
| 60 | 1 ± 0 | 22,1 |
| 70 | $1,2 \pm 0$ | 22,1 |
| 80 | $0,8 \pm 0$ | 22,5 |
| 90 | $1,2 \pm 0,1$ | 22,1 |
| 100 | $0,7 \pm 0$ | 22,1 |

Závislost elektrické vodivosti koagulačního roztoku na koncentraci ethanolu je znázorněna v grafu viz graf 5. Vliv vodivosti koagulačního roztoku na vznikající strukturu je diskutován dále.



Graf 5: Závislost elektrické vodivosti na koncentraci ethanolu v roztoku

3.3 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny

Byla provedena série experimentů zvlákňování do kapaliny, přičemž bylo měněno složení lázní kolektoru a hloubka bazénku tvořícího nádobu kolektoru. S výjimkou

experimentů zaměřených na sledování vlivu hloubky kolektoru byla hloubka bazénku 10 mm. Výsledky jsou diskutovány níže.

3.3.1 Vliv parametrů lázně kolektoru

3.3.1.1 Elektrická vodivost

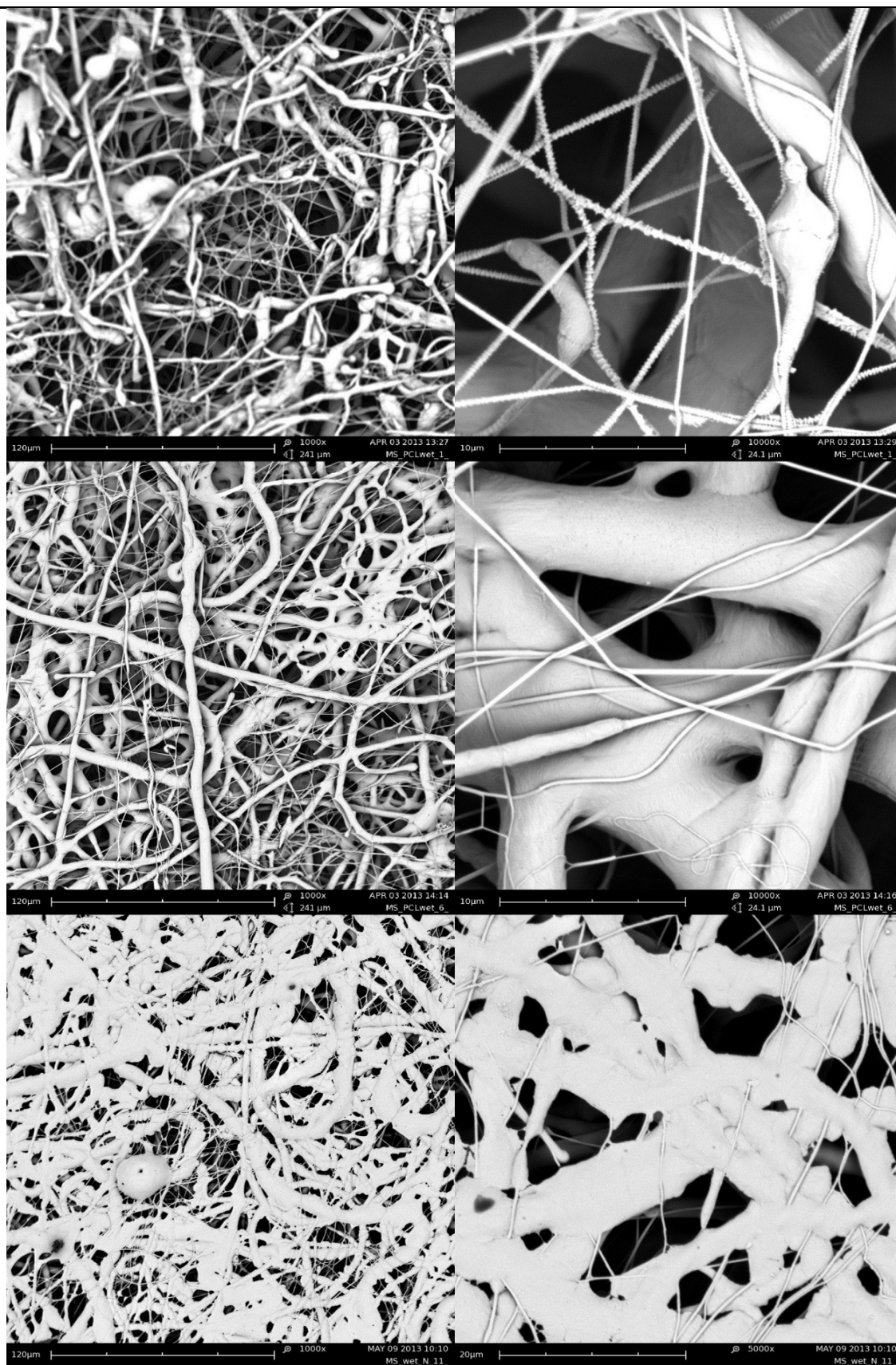
Z experimentů vyplývá, že elektrická vodivost roztoků kolektoru, která klesá se zvyšujícím se obsahem ethanolu, nemá v tomto konkrétním případě zásadní vliv na průběh elektrostatického zvlákňování. Zvlákňování probíhalo do všech roztoků tvořících kolektor bez ohledu na koncentraci ethanolu. Ve všech případech se vlákna tvořila po celé ploše kolektoru s rovnoměrnou distribucí. Je zřejmé, že pokud by se výrazně zvýšila elektrická vodivost kapaliny nad kolektorem (například přidáním soli), došlo by ke zlepšení procesu zvlákňování, respektive ukládání vláken do kapaliny. Toto ovlivnění charakteristik kapaliny nebylo studováno s ohledem na obavy ze zbytků solí nebo jiných aditiv ve výsledných materiálech směřovaných k použití v tkáňovém inženýrství.

3.3.1.2 Povrchové napětí

Z výsledků experimentů je patrné, že povrchové napětí roztoku kolektoru značně ovlivňuje průběh zvlákňování a výslednou morfologii připravených nanovláken.

Bylo zjištěno, že klesající koncentrace ethanolu, tedy rostoucí povrchové napětí, vede k záchytu vláken na hladině kapaliny. Při koncentracích ethanolu nad 60 % nedochází k záchytu vznikajících nanovláken na hladině lázně kolektoru a veškerý zvlákněný materiál se noří do kapaliny. U pokusů s roztoky s obsahem ethanolu mezi 30 až 50 % docházelo k částečnému zachytávání připravených vláken na povrchu kapaliny. Při nižších koncentracích ethanolu zůstával veškerý zvlákněný polymer na hladině.

Výsledky experimentů ukazují výrazné změny morfologie v závislosti na koncentraci ethanolu v kolektoru. Jak je patrné z obr. 16, zvlákněný materiál je ve všech případech tvořen jemnými a hrubšími vlákny a dvojí struktura zůstává ve všech případech zachována. S rostoucím povrchovým napětím klesá zastoupení hrubších vláken a roste podíl vláken s malými průměry, viz Graf 6 a Tabulka 9, největší nárůst četnosti výskytu vláken je v rozmezí průměrů 300 – 600 nm. Tyto změny se odráží v přechodu od nadýchaných struktur s vysokou pórovitostí k materiálům s kompaktnější strukturou a menším zastoupením pórů. Veškeré výsledky měření závislosti četnosti vláken na koncentraci ethanolu (povrchovém napětí) jsou uvedeny v příloze A.



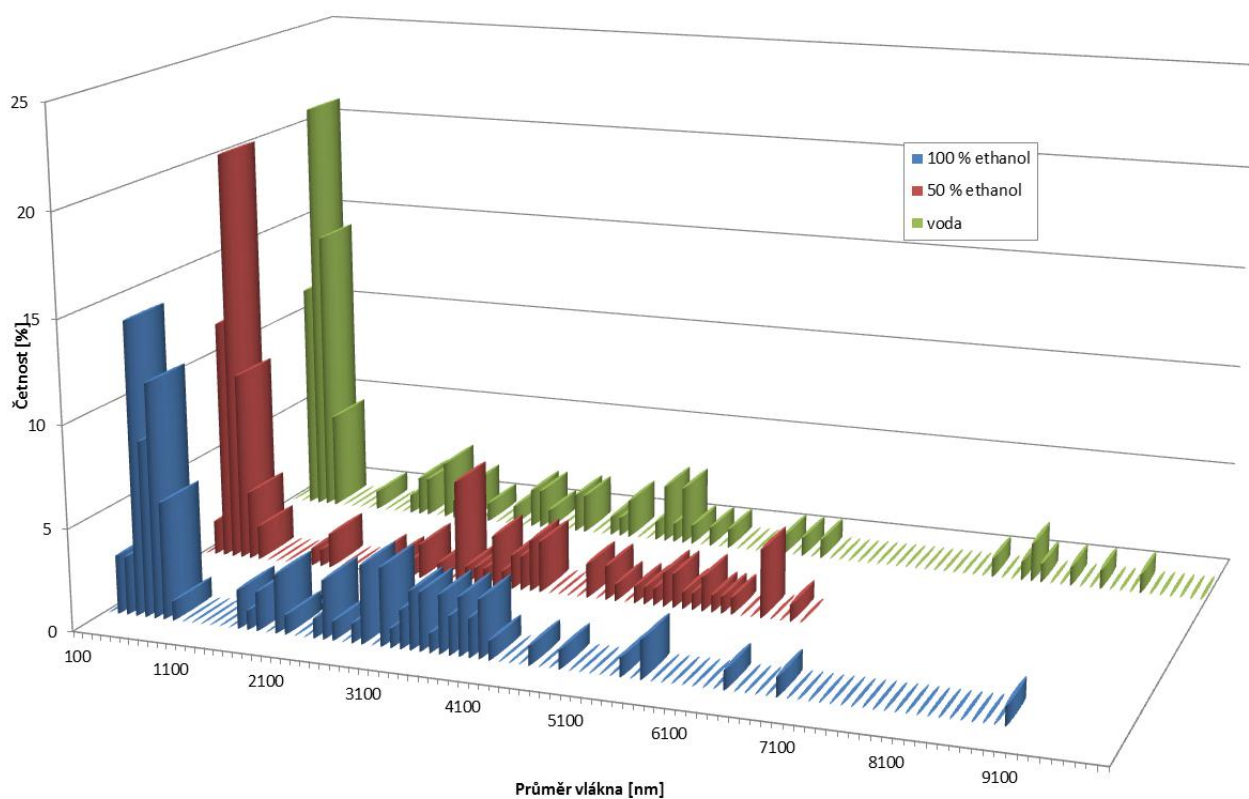
Obr. 16: Srovnání nanovláknenných struktur z PCL vyrobených elektrostatickým zvlákněním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem s různými koncentracemi ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 10 μm vpravo: 100 % hm. ethanol (nahore), 50 % hm. ethanol (uprostřed) a destilovaná voda (dole, měřítko u snímku vpravo 20 μm)

Vznik dvou různých druhů průměrů vláken ve vzorcích je potvrzen u všech výše popsaných experimentů při zvlákňování do kapaliny. Tento jev se vyskytuje v celém objemu vzorku, jak je patrné z lomů vyrobených materiálů (viz obr. 19). Vysvětlení tohoto jevu může být spojeno s použitím popsané směsi rozpouštědel, kde ethanol není rozpouštědlem pro PCL. Důkazem pro toto tvrzení je snímek materiálu vyrobeného elektrostatickým zvlákňováním PCL pouze z chloroformu (viz obr. 18). Na tomto snímku je zřejmé, že struktura hrubých vláken je podobná jako na snímcích na obr. 16, ale jemná vlákna se zde neobjevují. K vlastní tvorbě dvojího průměru vláken obsažených ve vzorcích zřejmě dochází díky štěpení trysky polymerního roztoku ve zvlákňovacím prostoru, tedy nedochází pouze k bičování (viz kapitola 1.2.3.5), ale i k dělení kapalinové trysky v nestabilní části elektrostatického zvlákňování. Dělení kapalinové trysky v průběhu elektrostatického zvlákňování PCL pozorovali i autoři článku [47]. Pro získání videozáznamu z vlastního zvlákňování pro vizualizaci procesu štěpení trysky byla snaha použít ve vybraných experimentech rychlokameru, avšak kapalinová tryska v čase výrazně měnila své postavení a nebylo možné dokonale zaostřit. Proto je zde uveden pouze snímek pořízený při speciálním intenzivním osvětlení zvlákňovacího prostoru (obr. 17).



Obr. 17: Snímek ze zvlákňovacího prostoru v průběhu elektrostatického zvlákňování do kapaliny (PCL, chloroform/ethanol, kapalina kolektoru 90 % hm. ethanol, napětí 20 kV).

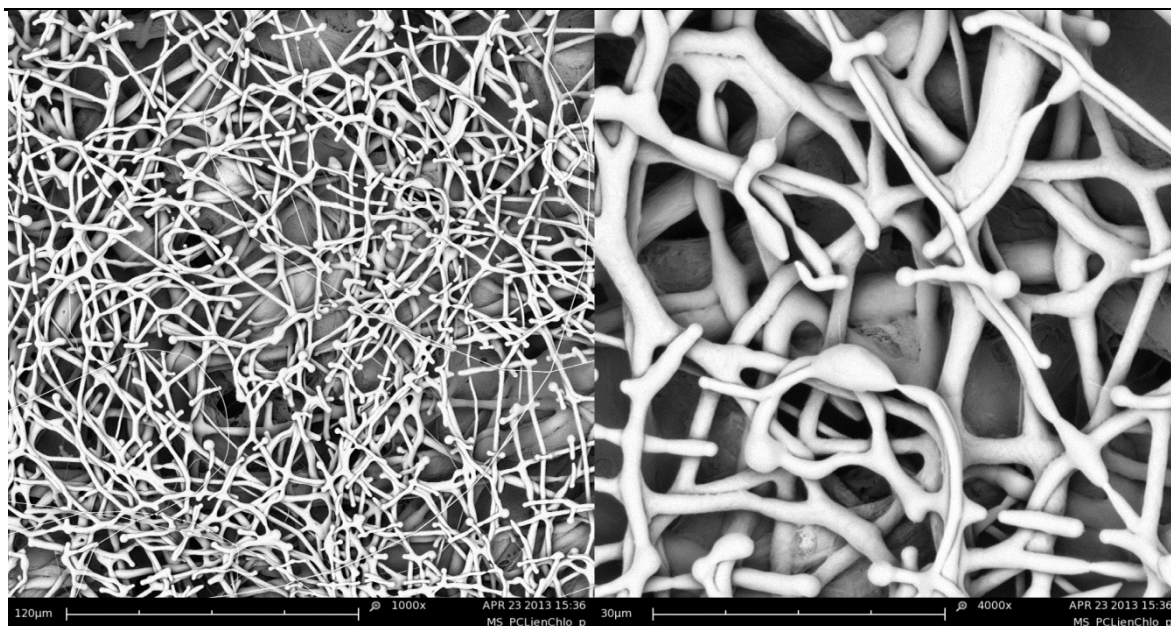
Změny v morfologii připravených materiálů s rostoucím povrchovým napětím jsou pravděpodobně způsobeny zvyšujícím se podílem vláken zachycených na hladině kolektoru. U vláken zachycených na hladině se zvyšuje pravděpodobnost kontaktu s dalšími vznikajícími vlákny, což vede ke vzniku materiálu kompaktnější struktury s menším zastoupením pórů.



Graf 6: Závislost četnosti vláken na jejich průměru pro roztoky kolektoru s koncentrací 100, 50 a 0 % hm. ethanolu

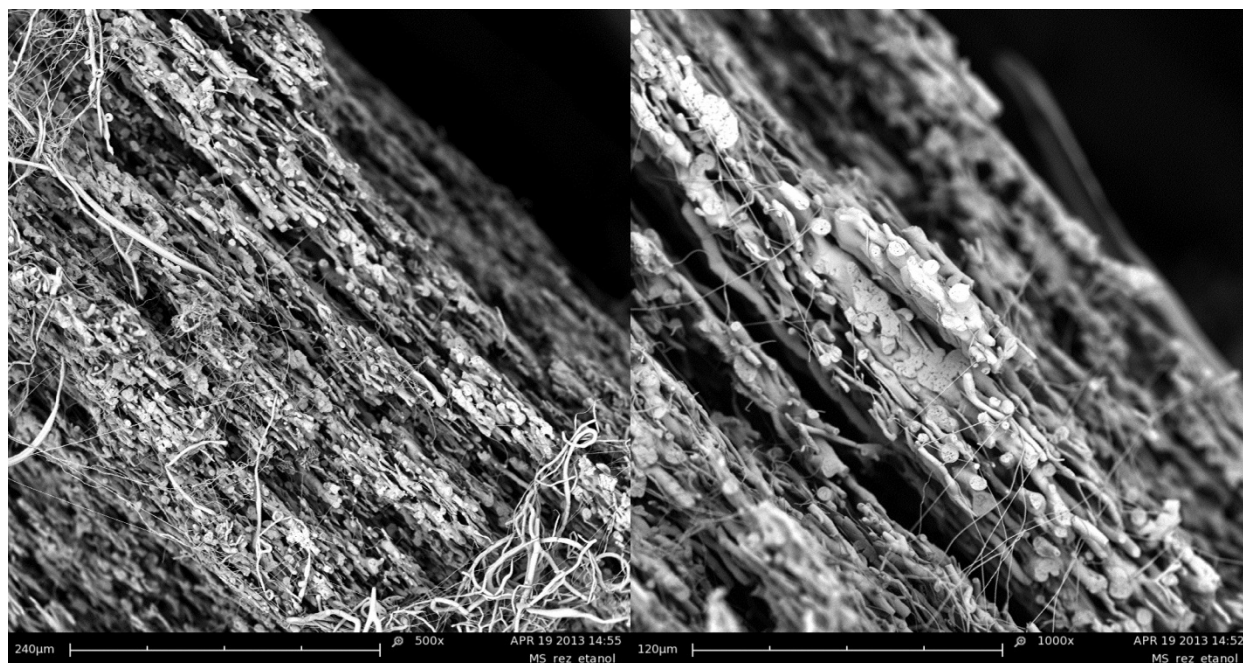
Tabulka 9: Závislost četnosti výskytu vláken v daném rozsahu průměrů na složení koagulační lázně

| Koagulační lázeň | Četnost výskytu vláken [%] v daném rozsahu průměrů | | |
|------------------|--|----------------|--------------|
| | 0 – 1000 nm | 1000 – 7000 nm | 300 – 600 nm |
| 100 % ethanol | 47,1 | 51,9 | 37,5 |
| 50 % ethanol | 48,7 | 48,7 | 45,3 |
| voda | 51,9 | 40,4 | 51,9 |

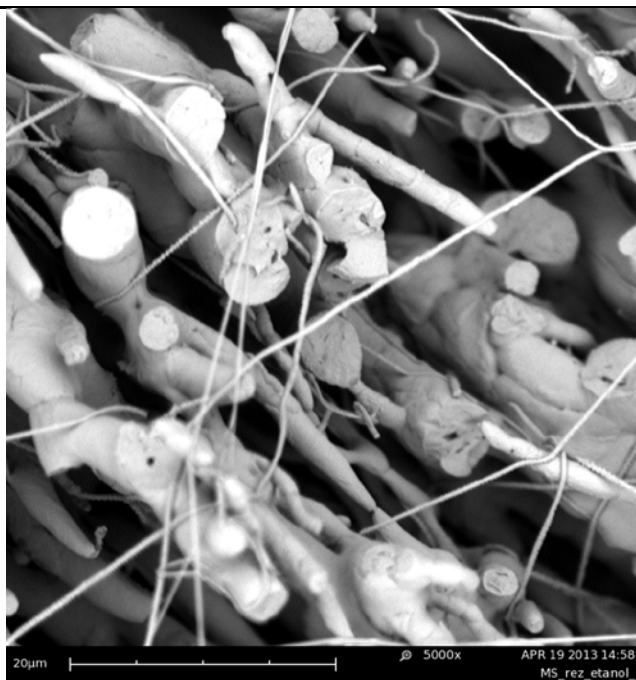


Obr. 18: Materiál vyrobený elektrostatickým zvlákněním roztoku PCL v chloroformu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 30 μm vpravo

Snímky řezů (lom materiálu v kapalném dusíku) materiálu připraveného v koagulační lázni s nízkým povrchovým napětím (100 % ethanol) potvrzují dvojí zastoupení vláken (jemných a hrubších) v celém objemu materiálu (obr. 19). Snímek s měřítkem 20 μm obr. 20 ukazuje přítomnost dutinek v hrubých vláknech, jejichž průměr je srovnatelný s průměrem jemných vláken. Snímek zároveň potvrzuje vysokou pórovitost materiálu s distribucí pórů v celém objemu

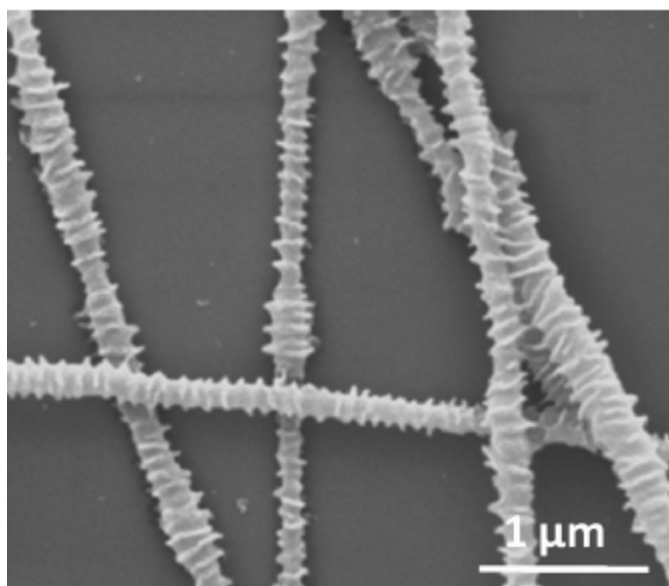


Obr. 19: Snímky ze SEM, řez vzorkem zvlákněným do 100 % hm. ethanolu měřítko vlevo 240 μm, vpravo 120 μm

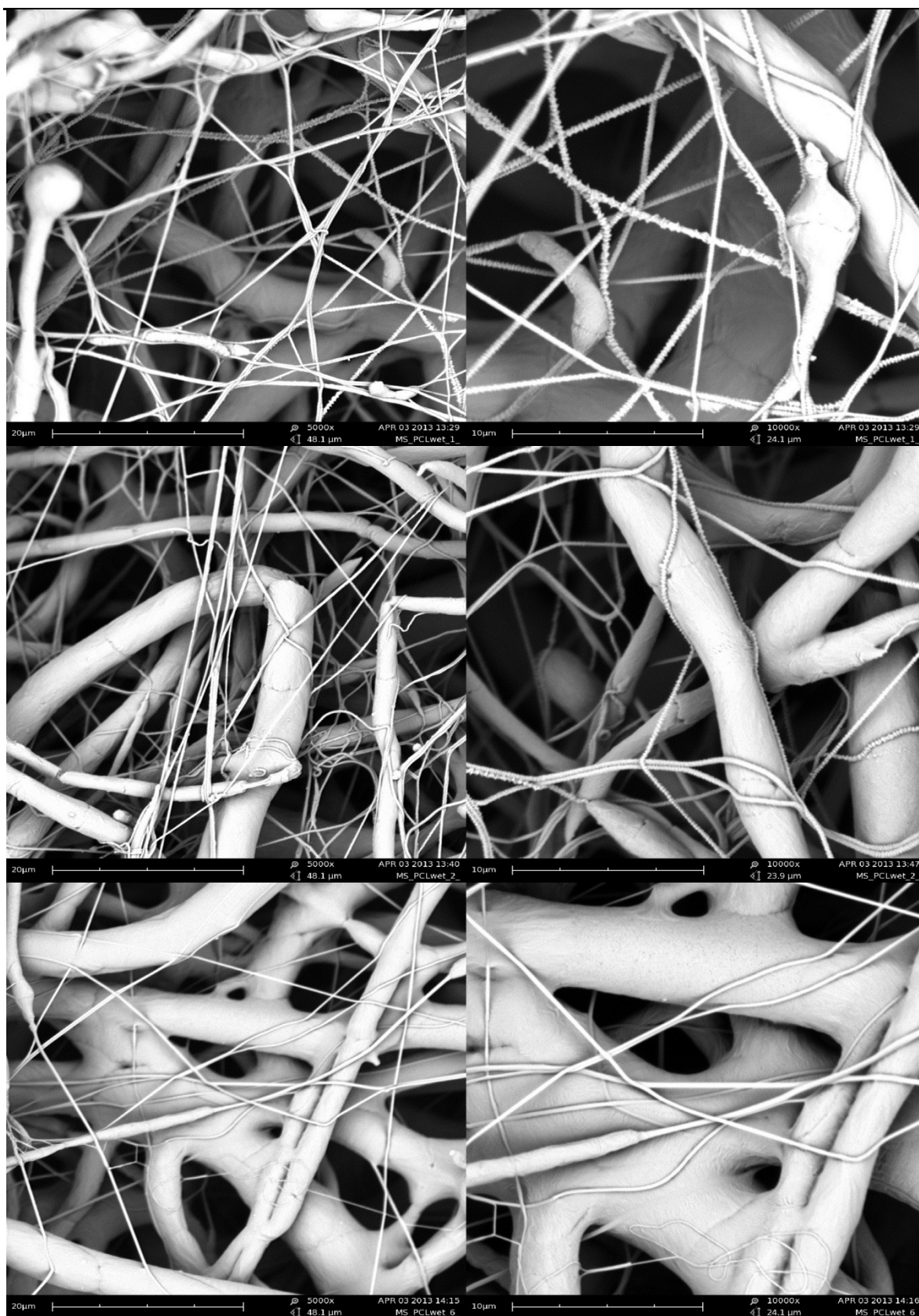


Obr. 20: Snímek ze SEM, řez vzorkem zvlákněným do 100 % hm. ethanolu měřítko 20 μm

Při zvláknování do roztoků kolektoru s nejmenším povrchovým napětím (100 a 90 % hm. ethanolu) bylo možné ve výsledných materiálech pozorovat strukturovaný povrch jemných vláken viz obr. 22 nahoře. Tento strukturovaný tvar vláken se podobá vláknům typu shish-kebab, kde se ve vlákně střídá různá krystalinita polymeru. Příklad podobně povrchově strukturovaných nanovláken je uveden na obr. 21. Vysvětlení pro vznik shih-kebab [46] struktury u jemných vláken ve vzorcích popisovaných v této bakalářské práci vyžaduje podrobnější studium těchto materiálů.

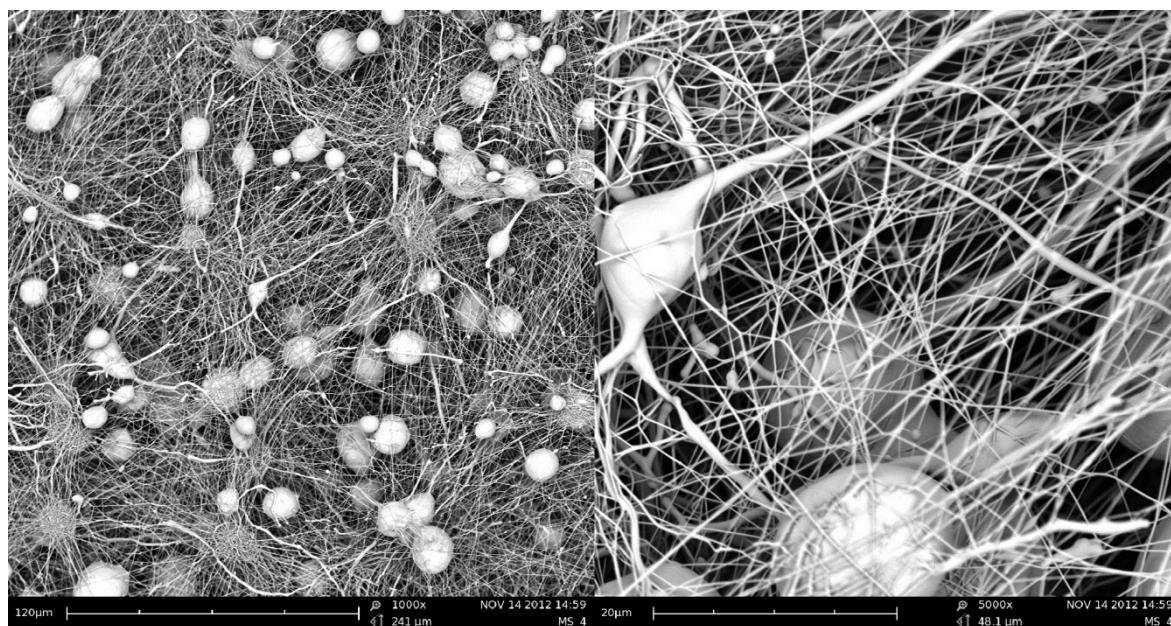


Obr. 21: Elektrostaticky zvlákněné nanovláknenné materiály z polyethylenoxidu se strukturou shish-kebab [46]



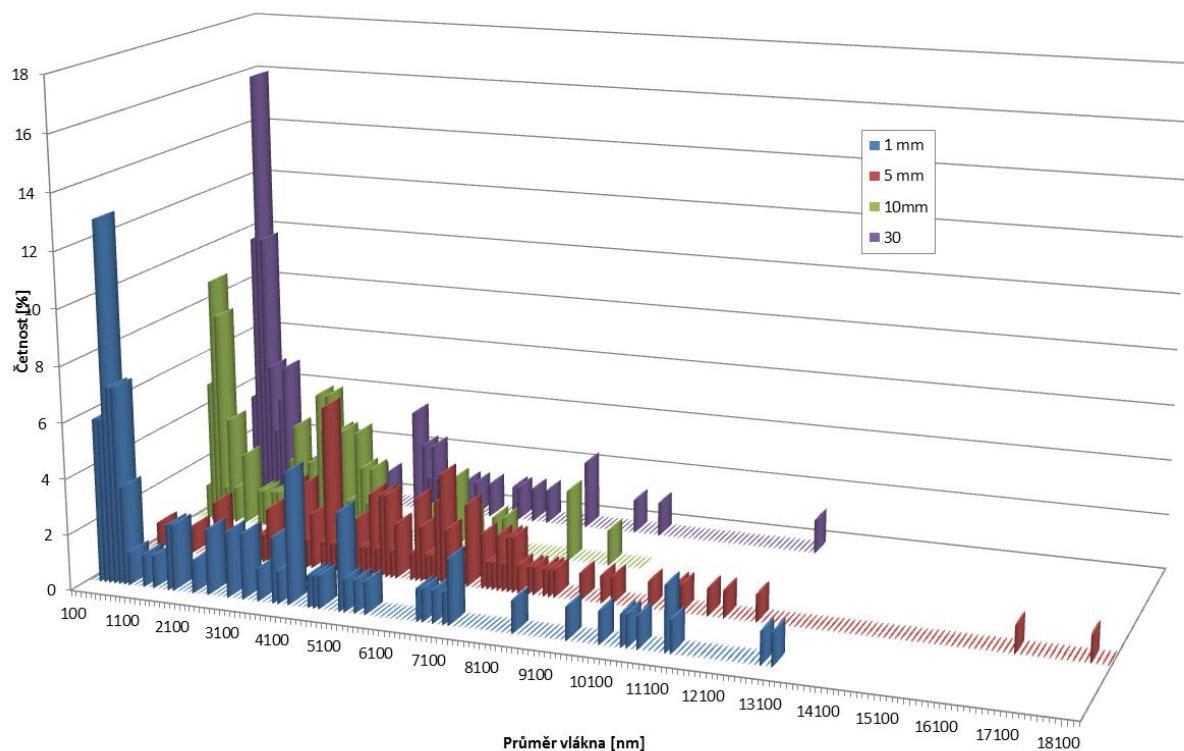
Obr. 22: Srovnání nanovláknenných struktur z PCL vyrobených elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem s různými koncentracemi ethanolu snímky ze SEM, měřítko 20 μm vlevo a 10 μm vpravo: 100 % hm. ethanol (nahore), 90 % hm. ethanol (uprostřed) a 50 % hm. ethanol

Materiál vyrobený pouze s kovovým kolektorem má zcela odlišnou morfologii. Z obr. 23 je patrné, že ve struktuře materiálu dominuje zastoupení jemných vláken s poměrně vysokou četností se vyskytují korálky (větší sférické útvary). Vlákná s většími průměry jsou zastoupena jen minimálně. Zřejmě dochází k tomu, že hrubší vlákna dopadají na rovinný kolektor v nevysušeném stavu a díky Rayleighově nestabilitě dochází k jejich přetvoření na kulovité útvary. Toto není pozorováno u zvlákňování do kapaliny, neboť kapalina působí na hrubá vlákna jako koagulační lázeň.

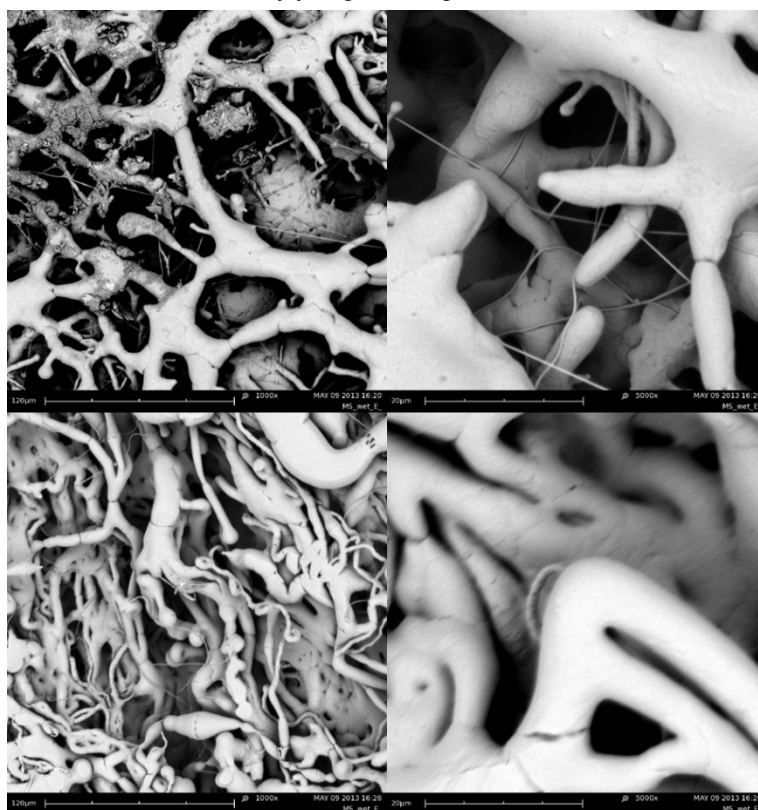


Obr. 23: Snímky ze SEM, měřítko 120 µm vlevo a 20 µm vpravo, materiálu z PCL připraveného elektrostatickým zvlákňováním s kovovým kolektorem

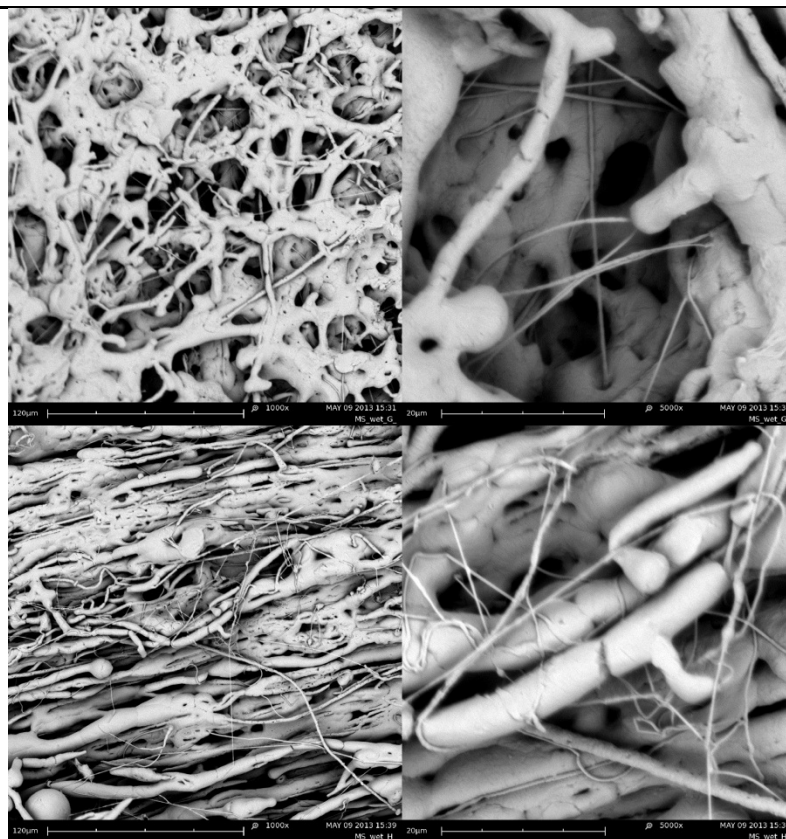
3.3.1.3 Hloubka kolektoru



Graf 7: Závislost četnosti vláken na jejich průměru pro hloubku bazénku 2,5; 5; 10 a 30 mm



Obr. 24: Snímky ze SEM, Srovnání nanovláknenných struktur z PCL vyrobených elektrostatickým zvlákněním do kapaliny s kolektorem tvořeným 90 % hm ethanolom s hloubkou kolektoru 2,5 mm (nahore) a 5 mm (dole), měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



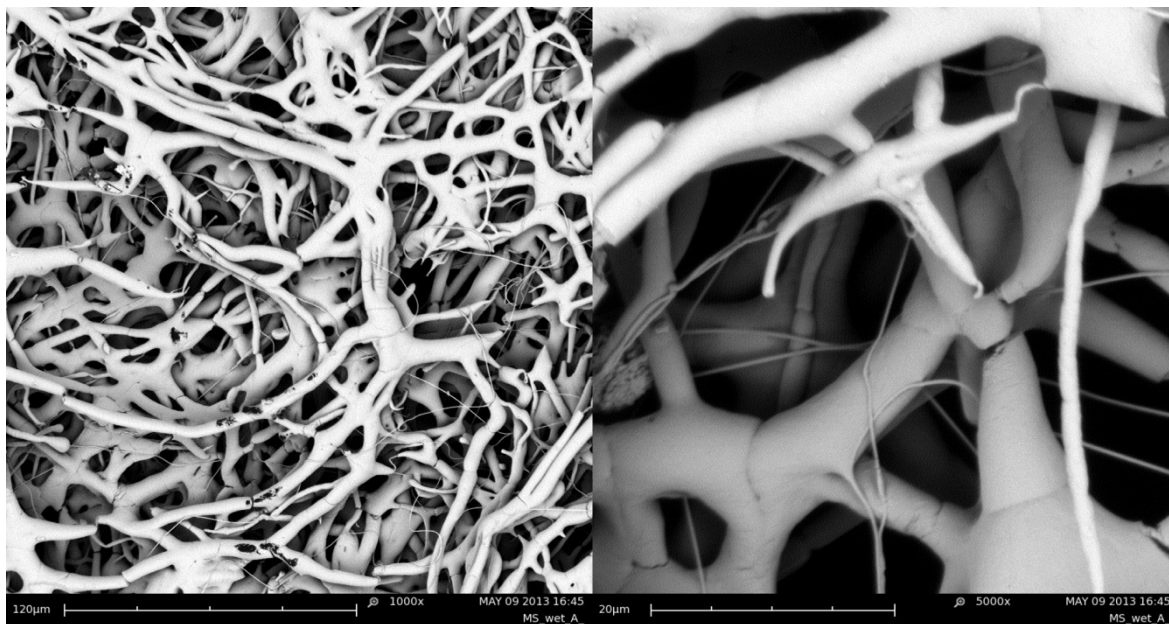
Obr. 25: Snímky ze SEM, Srovnání nanovláknenných struktur z PCL vyrobených elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným 90 % hm ethanolom s hloubkou kolektoru 10 mm (nahore) a 30 mm (dole), měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo

Z výsledků měření vlivu hloubky kolektoru na výslednou morfologii nanovláknenných struktur není patrný žádný převažující trend, což může být způsobeno velmi malou elektrickou vodivostí roztoků tvořících kolektor. U vzorku připraveného s použitím 5 mm hlubokého bazénku došlo k téměř úplnému vymizení jemných vláken, avšak ani toto nemusí být signifikantní z důvodu přípravy jediného vzorku. Z měření tedy vyplývá, že pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny s nízkou elektrickou vodivostí je zásadní vzdálenost jehly od kolektoru nikoliv hloubka bazénku tvořícího kolektor.

3.3.2 Vliv aparatury na elektrostatické zvlákňování do kapaliny

Během provádění experimentů bylo zjištěno několik nevýhod zkonstruovaného zařízení pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny. Především se jednalo o zachyt vláken na okrajích bazénku s koagulačním roztokem. Toto zachytávání se projevovalo se zvětšující se dobou zvlákňování a bylo způsobeno odpařováním koagulačního roztoku, čímž došlo k odkrytí horních okrajů bazénku. Pro odstranění vlivu zachytu vláken na okrajích bazénku byl plošný kolektor na dně bazénku nahrazen kovovou tyčinkou

z důvodu zacílení vyráběné struktury, ale tato změna nepřinesla žádný výrazný efekt. Struktura takto připraveného materiálu viz obr. 26.



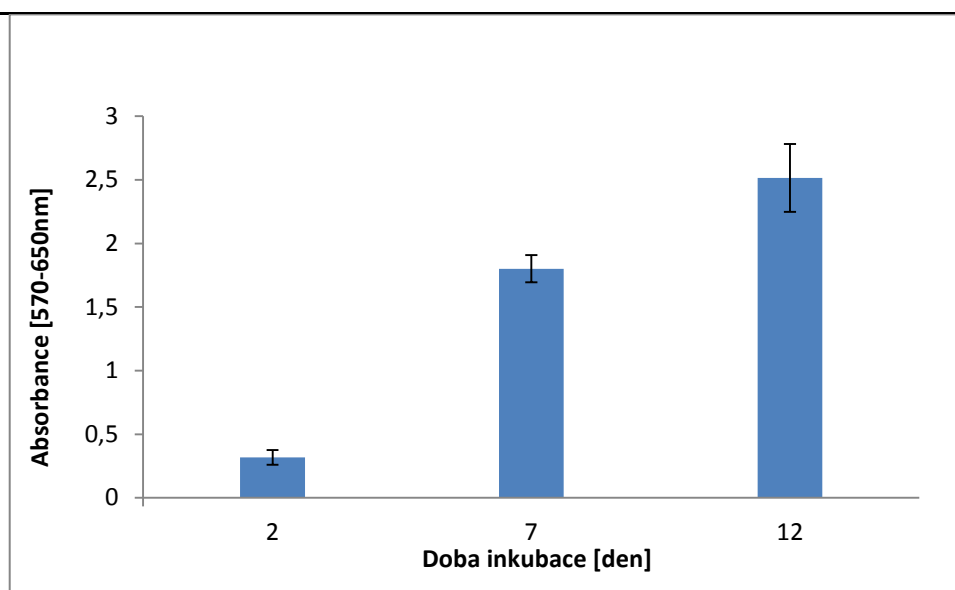
Obr. 26: Snímky ze SEM, nanovláknový materiál připravený elektrostatickým zvlákňováním do 90% ethanolu s použitím bazény s kovovou tyčkou (bodovým zdrojem) měřítko 120 μm (vlevo) a 20 μm (vpravo)

Možným řešením zamezení záchytu vláken na okrajích bazénku by bylo ponoření celého bazénku do rezervoáru s koagulačním roztokem (okraje bazénku pod hladinou) s případným nabíjením kolektoru opačným napětím ke zvýšení potenciálu mezi jehlou a kolektorem.

3.4 Mikrobiologické testy

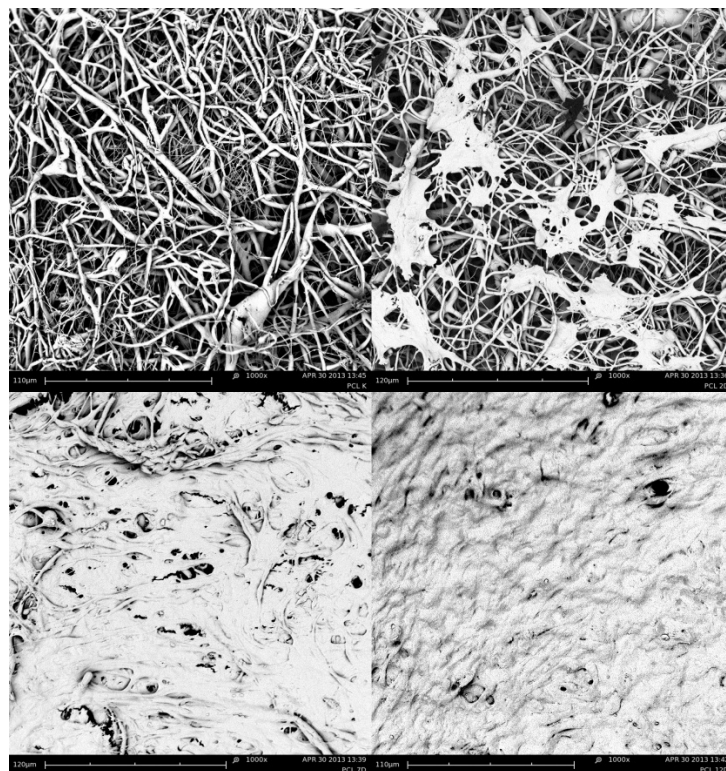
Výsledky zkoumání morfologie nanovláknových struktur připravených v roztocích s nízkým povrchovým napětím (s vyšším obsahem ethanolu) ukazují, že získaný materiál splňuje parametry pro využití jako scaffold ve tkáňovém inženýrství.

Pro ověření schopnosti použití připravených nanovláknových struktur ve tkáňovém inženýrství byl proveden mikrobiologický test s kultivací 3T3 myších fibroblastů. Jako substrát byl použit vzorek připravený elektrostatickým zvlákňováním do koagulačního roztoku, tvořeného 90% ethanolem. Metodika experimentu je uvedena v kap. 2.2.5. Kultivace byla prováděna po dobu dvanácti dnů a vzorky byly průběžně sledovány. Kvantifikace buněk na nanovláknovém substrátu byla prováděna nepřímou metodou (MTT test 2.2.5.3), z inkubační křivky (graf 8) je patrný nárůst počtu buněk v substrátu.



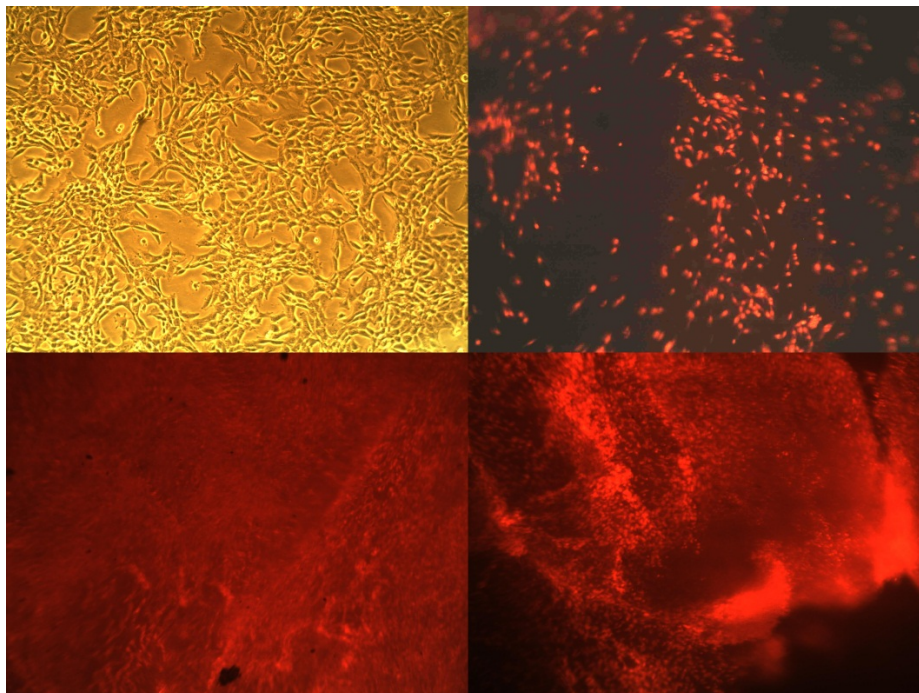
Graf 8: Závislost absorbance na délce inkubace

Postupné osídlování substrátu kultivovanými buňkami bylo sledováno i skenovací elektronovou mikroskopií (obr. 27): ze snímků je patrný postupný nárůst buněčné kultury na nanovlákněném materiálu a po dvanácti dnech je substrát prakticky homogenně prorostlý buněčnou kulturou.



Obr. 27: Snímky ze SEM, měřítko 12 μ m: vlevo nahoře nanovlákněný substrát před nasazením buněk, dále 3T3 fibroblasty na PCL substrátu po 2, 7 a 12-ti dnech inkubace. Ze snímků je patrné postupné osídlování materiálu buňkami.

Obdobně bylo ověřeno postupné osídlování substrátu pozorováním fluorescenčním mikroskopem (Obr. 28).



Obr. 28: Snímek 3T3 myších fibroblastů z optického mikroskopu (vlevo nahoře), snímky z fluorescenčního mikroskopu 3T3 fibroblastů na PCL nanovlákněném materiálu po 2, 7 a 12-ti dnech inkubace.

Z výsledku experimentu lze učinit závěr, že použitý nanovlákněný materiál byl vhodným substrátem pro kultivaci buněk in vitro, což naznačuje potenciální využití materiálů připravených technikou elektrostatického zvlákňování do kapaliny v oblasti tkáňového inženýrství.

Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem elektrostatického zvlákňování do kapaliny. V bakalářské práci jsou shrnuty informace, které umožňují pochopení fyzikálních a teoretických základů přípravy nanovláken se zvláštním zřetelem na metodu elektrostatického zvlákňování. K získání základních informací použitých jako východisko pro experimentální práci byla provedena literární rešerše speciálně zaměřená na elektrostatické zvlákňování do kapaliny.

Byla navržena a zkonstruována aparatura pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny. V rámci experimentálních prací byla ověřena její funkčnost a vhodnost pro přípravu nanovláknenných materiálů. Provedené experimenty byly zaměřeny na elektrostatické zvlákňování do kapaliny z roztoku polykaprolaktonu, kdy jako koagulační lázně bylo použito směsí ethanolu-vody různého složení. Vybraný vzorek nanovláknenného materiálu byl použit jako matrice pro kultivaci buněk. Pro zhodnocení experimentů bylo použito informací získaných skenovací elektronovou mikroskopií, fluorescenční mikroskopií, absorpční spektroskopií, tenziometrií, konduktometrií a obrazovou analýzou. Výsledky experimentů jsou podrobně diskutovány v předcházející kapitole.

Byly nalezeny vhodné podmínky pro přípravu nanovláknenných materiálů žádoucí morfologie a byla naznačena cesta k jejich využití ve tkáňovém inženýrství. Konkrétně jako nejlepší postup výroby materiálů byl na základě všech experimentů vybrán tento: 15 % hm. PCL ve směsi rozpouštědel (chloroformu a ethanolu v poměru 9 : 1) zvlákňovaný do roztoku 90% ethanolu. Tento vzorek vykazoval dvojí průměry vláken v celém svém objemu a tvořil trojrozměrnou nadýchanou strukturu v kapalině. Dvojí průměry vláken, které se v těchto vzorcích vyskytovaly, mají potenciálně výhodnou strukturu pro aplikaci v tkáňovém inženýrství, neboť jemná vlákna umožní dobrou adhezi buněk a hrubá vlákna zajistí dobrou mechanickou odolnost a větší póry, se zachováním velké porózy materiálu.

Předmětem dalšího studia by mohla být optimalizace podmínek přípravy nanovláknenných materiálů z polykaprolaktonu a ověření možností elektrostatického zvlákňování do kapaliny při přípravě materiálů z jiných výchozích polymerů. Využití připravených materiálů v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně bude vyžadovat další podrobné mikrobiologické zkoumání.

Seznam literatury

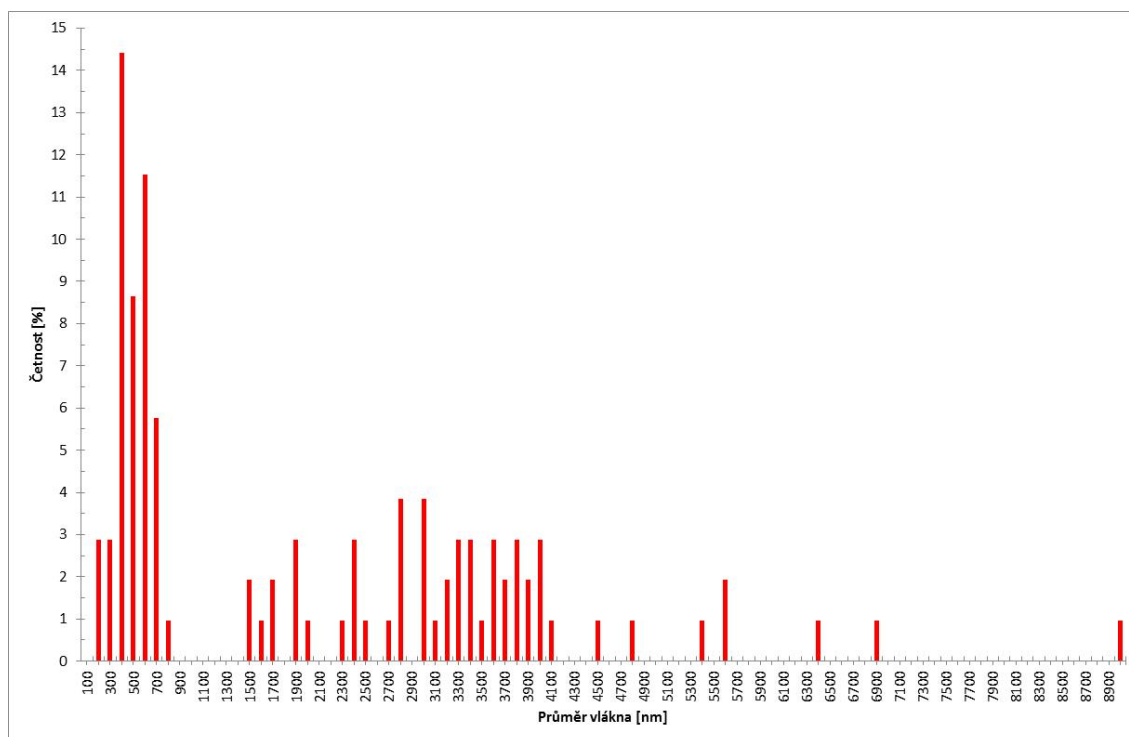
- [1] MILLER C. J. et al., *The Handbook of Nanotechnology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005, ISBN: 978-0-471-69991-0
- [2] KUMAR S., CHALLA S., *Nanotechnologies for the Life Sciences* Vol. 9: Tissue, Cell and Organ Engineering, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006, ISBN: 3-527-31389-3
- [3] POPAT K., *Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, CRC Press, Boca Raton, 2011, ISBN: 978-1-4398-0142-0
- [4] *Nafigate* [online]. 30.11. 2012. URL:
<http://www.nafigate.com/cs/section/portal/app/portal-article/detail/69818-o-nanovlaknech>
- [5] ANDRADY A. L., *Science and Technology of Polymer Nanofibers*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2008, ISBN: 978-0471790594
- [6] COOLEY, J., *Apparatus for Electrically Dispersing Fluids* U.S. Pat. 692 631, 1902
- [7] RAMAKRISHNA S., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing, New Jersey 2005, ISBN: 981-256-415-2.
- [8] STANGER J. et.al., *Electrospinning* (Rapra Review Reports, Volume 16, Number 10, 2005), Smithers Rapra Technology, Shawbury, 2005, ISBN: 978-1-84735-091-6
- [9] HE J.-H. et al., *Electrospun Nanofibres and Their Applications*, iSmithers, Shawbury, 2008, ISBN: 978-1-84735-145-6
- [10] TEO W. et.al., *Technological Advances in Electrospinning of Nanofibers*, Science and Technology of Advanced Materials, 2011, Vol. 12, p. 1 – 19
- [11] PHAM Q. et. al., *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*, Tissue Engineering, 2006, Vol. 12, p. 1192 – 1211
- [12] *Technologie Nanospider™ společnosti Elmarco s. r. o.*, Liberec, 2010, firemní prezentace [online], 10.5. 2013, URL:
http://japatech.zelenausporam.cz/gallery/0/30-5_technologie_nanospider_spolecnosti_elamrco_stanislav_petrik.pdf
- [13] BHARDWAJ N., Subhas K., *Electrospinning a fascinating fiber fabrication technique*, Biotechnology Advances, 2010, Vol. 28, p. 325 – 347

-
- [14] LENG Y., *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*, John Wiley & Sons, Singapore, 2008, ISBN: 978-0-470-82298-2
- [15] YAO N., WANG Z. L., *Handbook of microscopy for nanotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 2005
- [16] MICHLER G. H., *Electron Microscopy of Polymers*, Springer, Berlin, 2008, ISBN: 978-3-540-36350-7
- [17] EATON P, WEST P., *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, Oxford, 2010, ISBN: 978-0-19-957045-4
- [18] HÖHNE G. W. H., HEMMINGER W. F., FLAMMERSHEIM H.-J., *Differential Scanning Calorimetry*, Springer, Berlin, 2003, ISBN: 978-3-642-05593-5
- [19] STUART B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2004, ISBN: 978-0-470-85428-0
- [20] LAMBERT J. B., MAZZOLA, E. P., *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*, Prentice Hall, Upper Saddle River, 2003, ISBN: 978-0130890665
- [21] LEE K. H. et. al., *Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamid electrospun poly(vinylchloride)nonwovents*, Polymer Physics, 2002, Vol. 46, p. 2259 – 2268
- [22] LEE J. H. et. al., *Design, synthesis and electrospinning of a novel fluorescent polymer for optical sensor applications*, Materials Research Society Symposium, 2002, p . 403 – 408
- [23] ZHONG S. et. al., *Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibers Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review*, Tissue Engineering, 2012, Vol. 18, p. 77 – 87
- [24] WASSERCHEID P., STARK A., *Handbook of Green Chemistry, Volume 6: Ionic Liquids*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2010, ISBN: 978-3-527-325924
- [25] VISWANATHAN G. et. al., *Preparation of Biopolymer Fibers by Electrospinning from Room Temperature Ionic Liquids*, Biomacromolecules, 2006, vol. 7, p. 415 – 417
- [26] QUAN S. et. al., *Characterization of cellulose fibers electrospun using ionic liquids*, Cellulose. 2010, vol. 17, p. 223 – 230
-

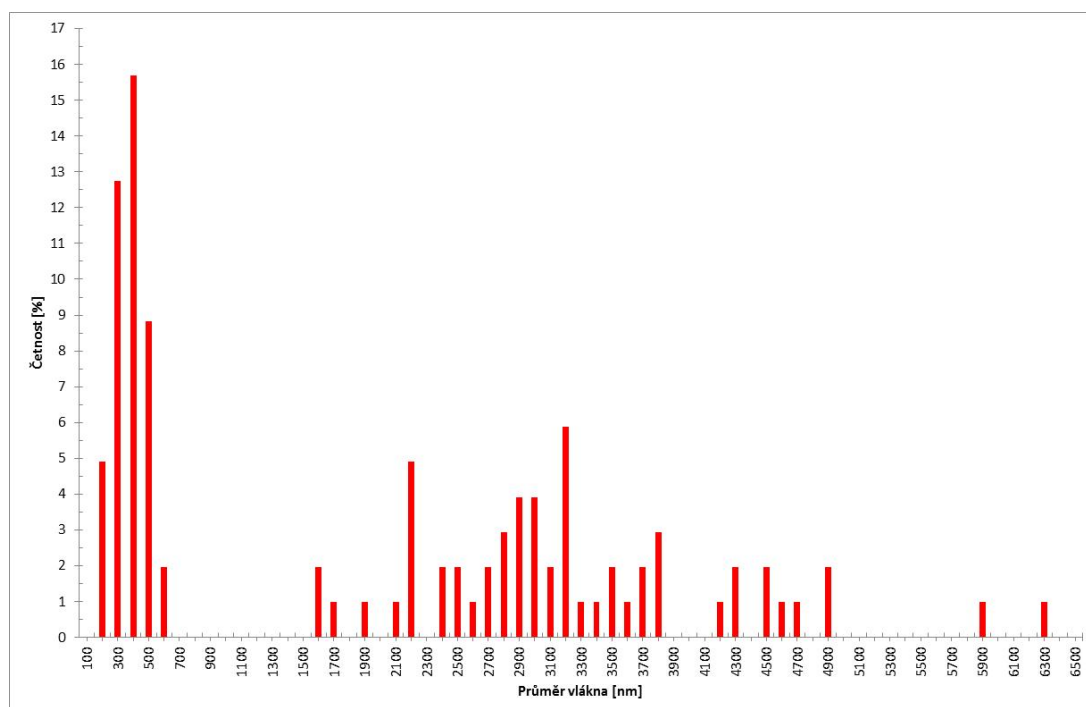
-
- [27] BARBER P. et. al., *Electrospinning of Chitin Nanofibers Directly from an Ionic Liquid Extract of Shrimps Shells*, Green Chemistry. 2012. Accepted manuscript
 - [28] YANG.W. et.al., *Poly (m-Phenyl Isophthalamide) Ultrafine Fibers from an Ionic Liquid Solution by Dry-Jet-Wet Electrospinning*, Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics. 2006. vol. 45, p. 573 – 579
 - [29] HASHIZUME R. et. al., *Morphological and Mechanical Characteristics of the Reconstructed Rat Abdominal Wall Following use of Wet Electrospun Biodegradable Polyurethane Elastomer Scaffold*, Biomaterials, 2010. vol. 31. p. 3253 – 3265
 - [30] EGASHIRA M. et. al., *Study on Wet Electrospinning Process*, Seni Gakkaishi, 2009, vol. 65, p. 156 – 160
 - [31] *Electrospinning method and fiber-producing apparatus for executing the same*, Jap. Pat. 2009-074224
 - [32] EGASHIRA M. et. al., *Effects of Rhodamine B on Wet Electrospinning*, Seni Gakkaishi, 2010, vol. 66, p. 181 – 186
 - [33] YOKOYAMA Y. et. al., *Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric*, Materials Letters. 2009. Vol. 63. p. 754 – 756
 - [34] ASHRAF, A., AWAD K., *Wet-electrospun CuNP/carbon nanofibril composites: potential application for micro surface-mounted components*, Appl Nanosci, 2012, vol. 2, p. 55 – 61
 - [35] WANG X. et. al., *Poly(ethyleneimine) nanofibrous affinity membrane fabricated via one step wet-electrospinning from poly(vinyl-alcohol)-doped poly(ethyleneimine) solution system and its application*, Journal of Membrane Science, 211, vol. 379, p. 191 – 199
 - [36] SHIN T. et. al., *Development of 3-D poly(trimethylenecarbonate-co- ϵ -caprolactone)-block-poly-(p-dioxanone)scaffold for bone regeneration with high porosity using a wet electrospinning method*, Biotechnology Letters, 2010, vol. 32, p. 877 – 882
 - [37] EBERLI D., *Tissue Engineering*. InTech, Rijeka, 2010, ISBN: 978-953-307-079-7
 - [38] SZPALSKI C. et. al., *Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques-Part I: Scaffolds*, Tissue Engineering, 2012, Vol. 18, p. 246 – 257
-

-
- [39] VARADA V. et. al., *Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems*, John Wiley & Sons, Hoboken 2008, ISBN: 9780470033517
- JAIN K. K., *The Handbook of Nanomedicine*, Humana Press, Totowa, 2008, ISBN: 978-1-60327-318-3
- [40] SCHULZ J. M., SHANOV V. N., YUN Y., *Nanomedicine Design of Particles, Sensors, Motors, Implants, Robots, and Devices*, Artech House, Boston, 2009, ISBN: 978-1-59693-279-1.
- [41] PALLUA N., SUSHEK C. V., *Tissue Engineering From Lab to Clinic*, Springer, Berlin, 2011, ISBN: 978-3-642-02823-6
- [42] SANTORO M., PERALE G., *Using synthetic bioresorbable polymers for orthopedic tissue regeneration*, in JENKINS M., STAMBOULIS A., *Durability and reliability of medical polymers*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2012, 119-140
- [43] LAURENCIN T. C., NAIR S. L., *Nanotechnology and Tissue Engineering The Scaffold*, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2010, ISBN: 978-953-307-079-7
- [44] COOPER K., NATHAN A., VYAKARNAM M., *Poly(ϵ -Caprolactone-co-Glycolide): Biomedical Applications of a Unique Elastomer*, in Domb, A. J., Kumar, N., Ezra, A., *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, ISBN: 9781118015797
- [45] GHAREMANI H. et al., *Measuring surface tension of binary mixtures of water + alcohols from the diffraction pattern of surface ripples*, *Der Chimica Sinica*, 2011, 2(6), p. 212 – 221
- [46] WANG B. et. al., *Hierarchically Ordered Polymer Nanofibers via Electrospinning and Controlled Polymer Crystallization*, *Macromolecules*, 2008, vol. 41, p 9516 – 9521
- [47] RENEKER H. D., A. L. YARIN, *Electrospinning jets and polymer nanofibers*, *Polymer*, 2008, vol. 49, p. 2387 – 2425
-

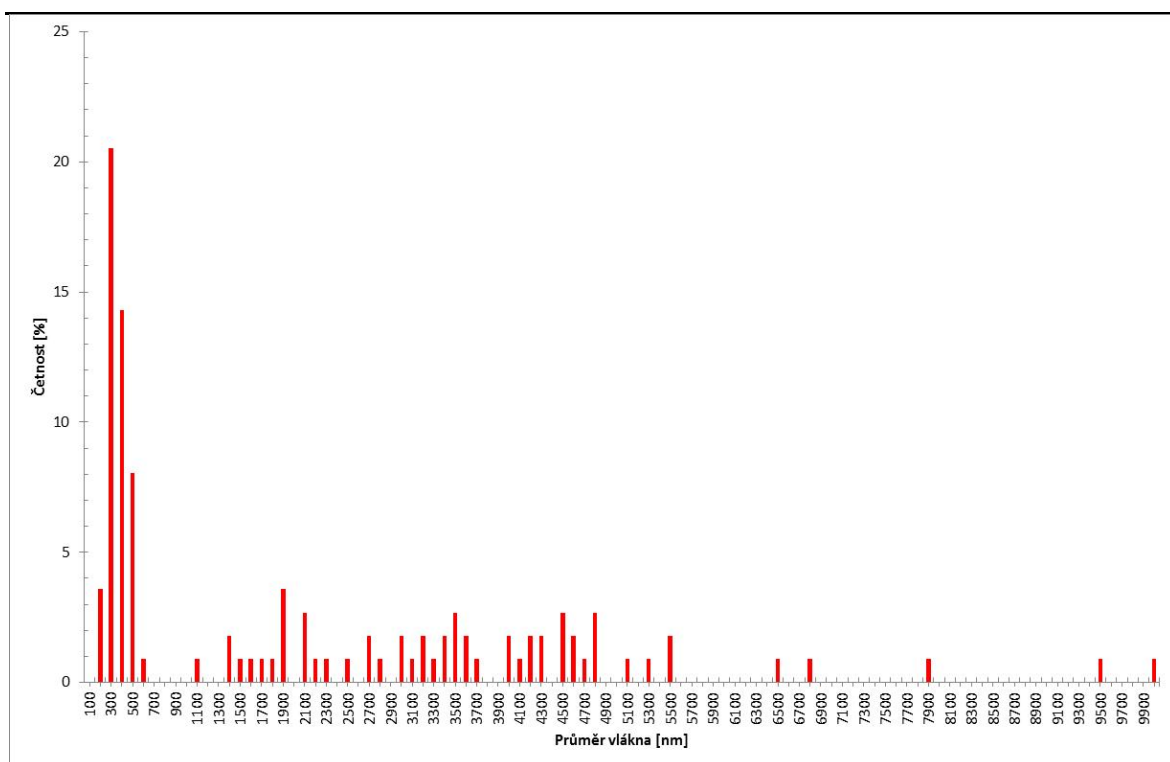
Příloha A - Závislost četnosti vláken na jejich průměru pro roztoky kolektoru s různým obsahem ethanol



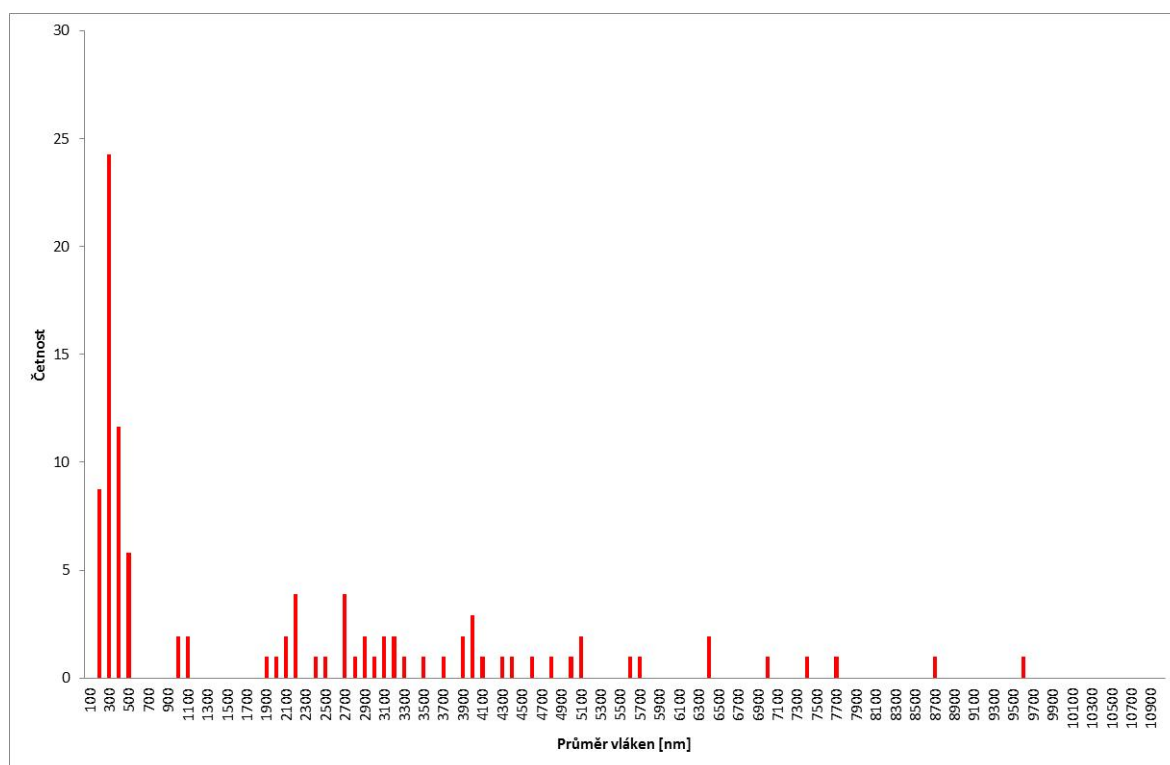
Obr. 29: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 100 % hm. ethanol



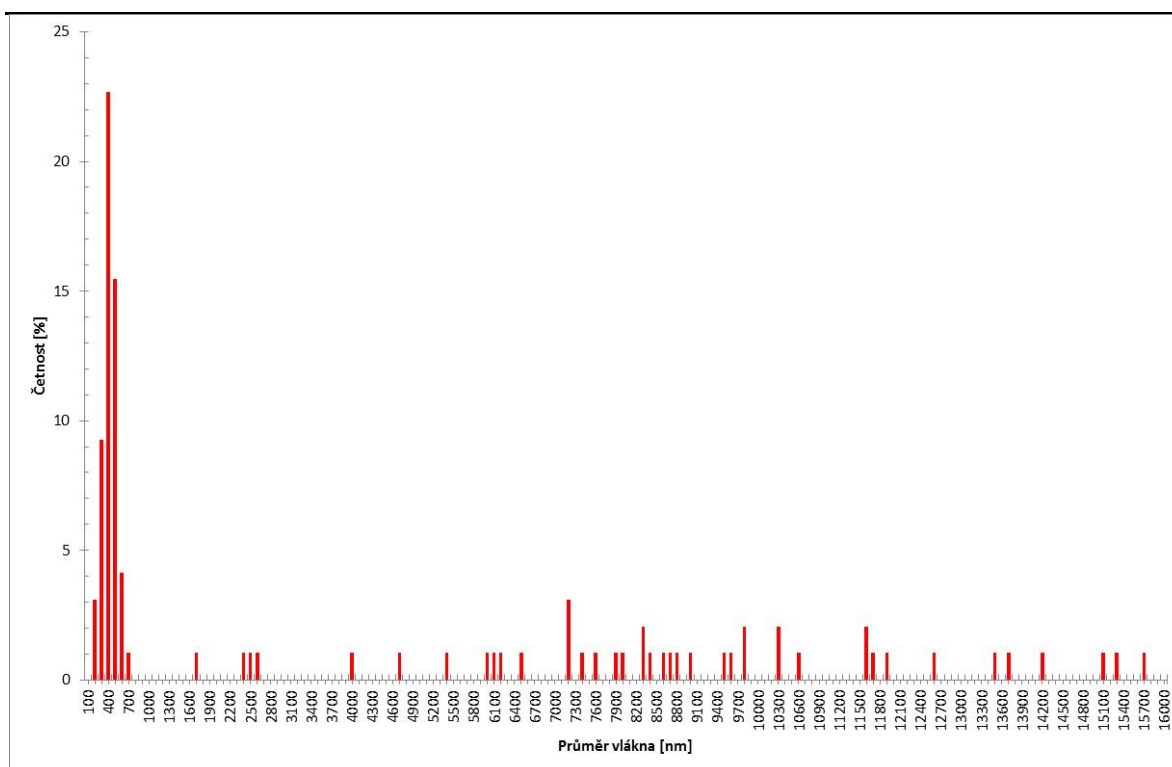
Obr. 30: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 90 % hm. ethanol



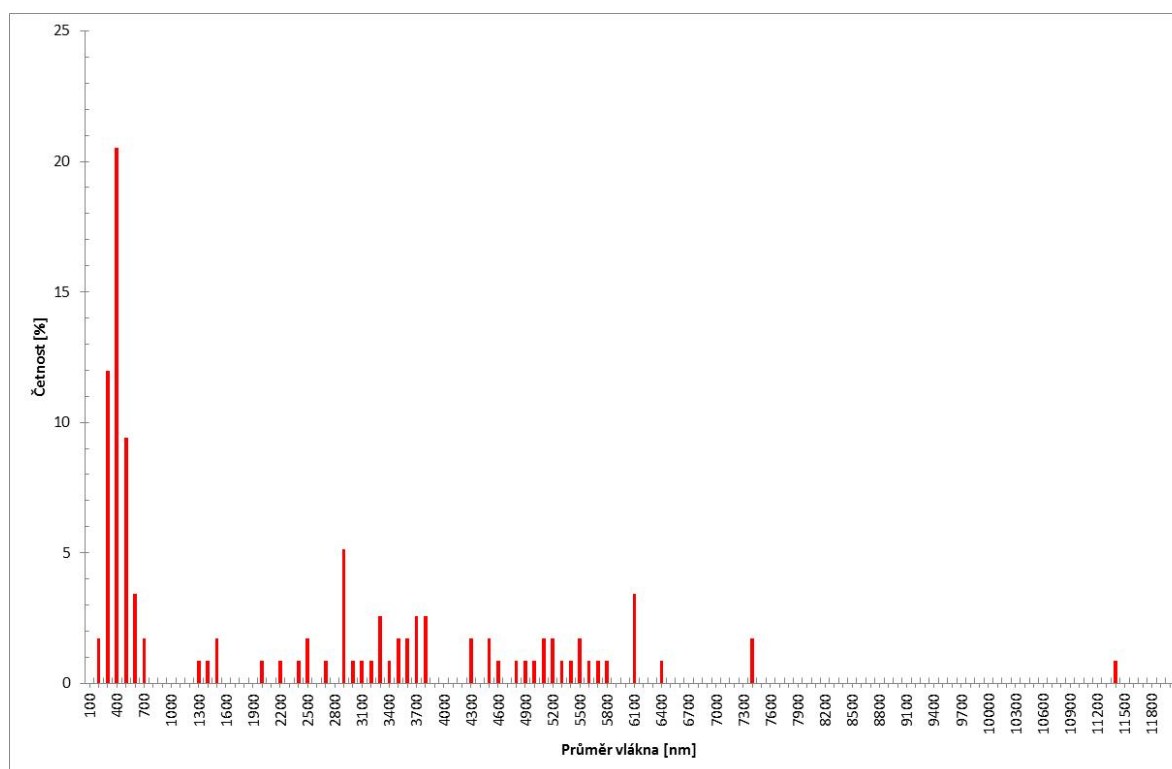
Obr. 31: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 80 % hm. ethanol



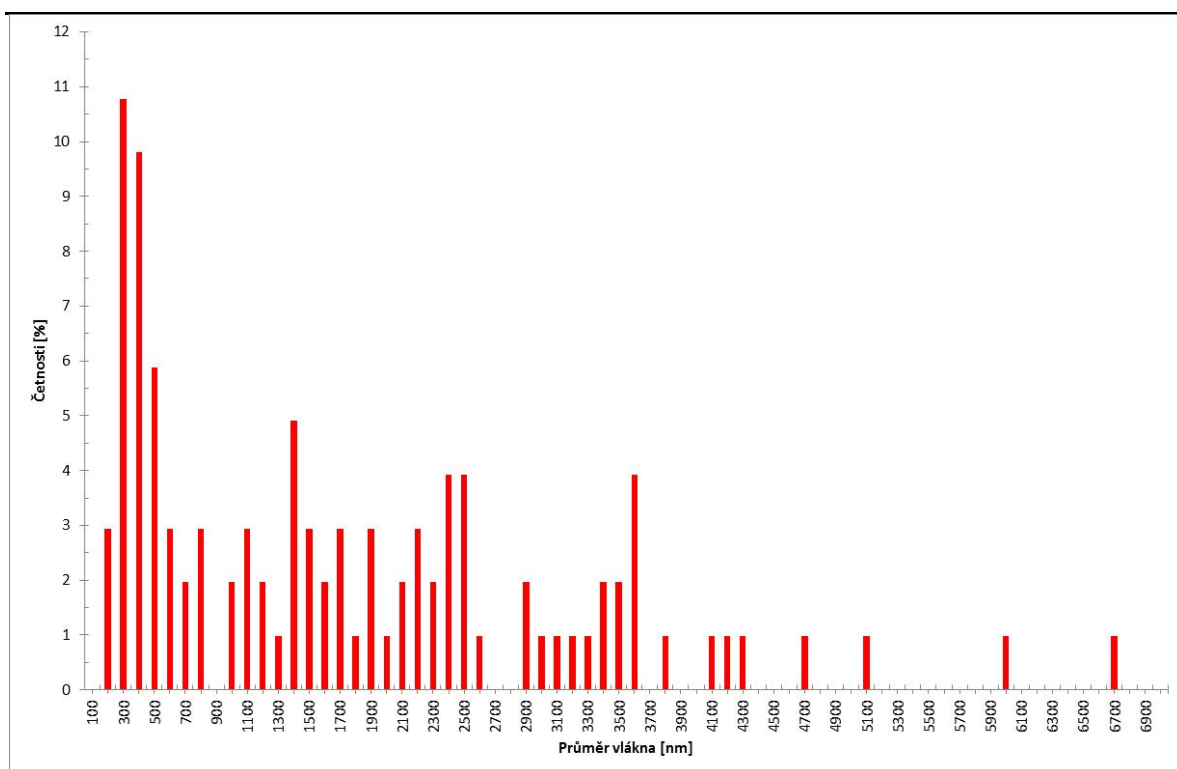
Obr. 32: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 70 % hm. ethanol



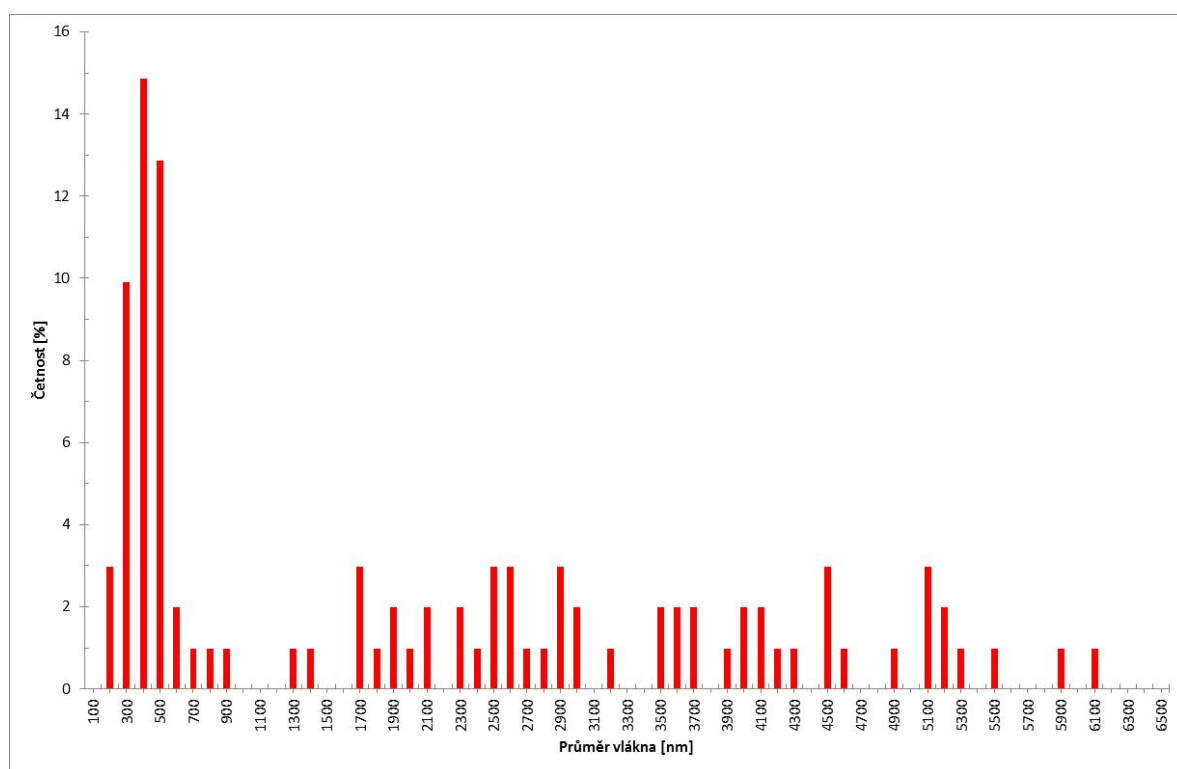
Obr. 33: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 60 % hm. ethanol



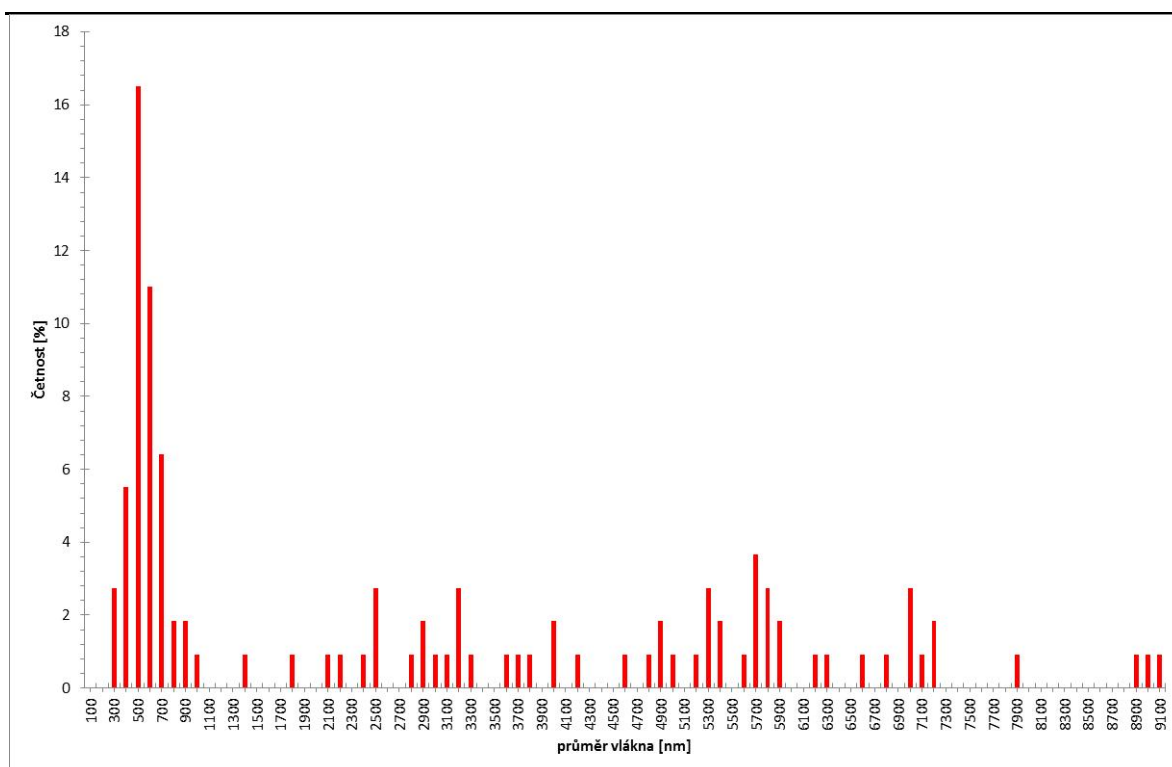
Obr. 34: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 50 % hm. ethanol



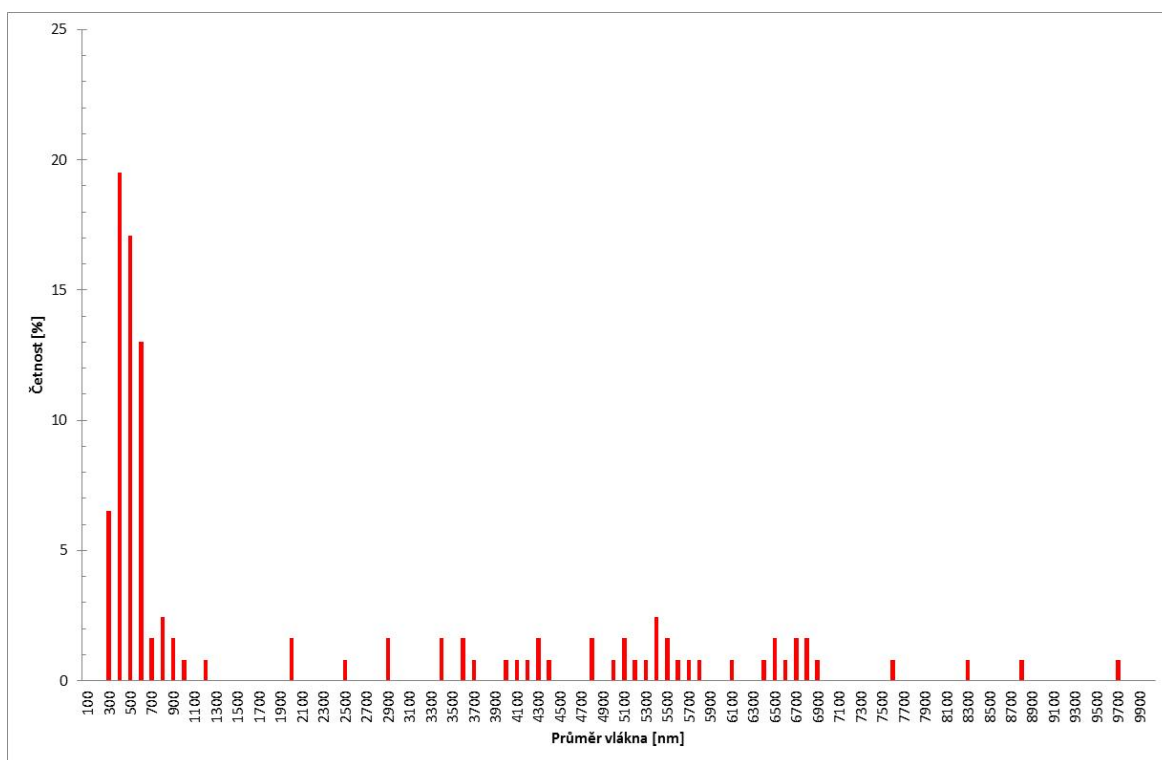
Obr. 35: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 40 % hm. ethano



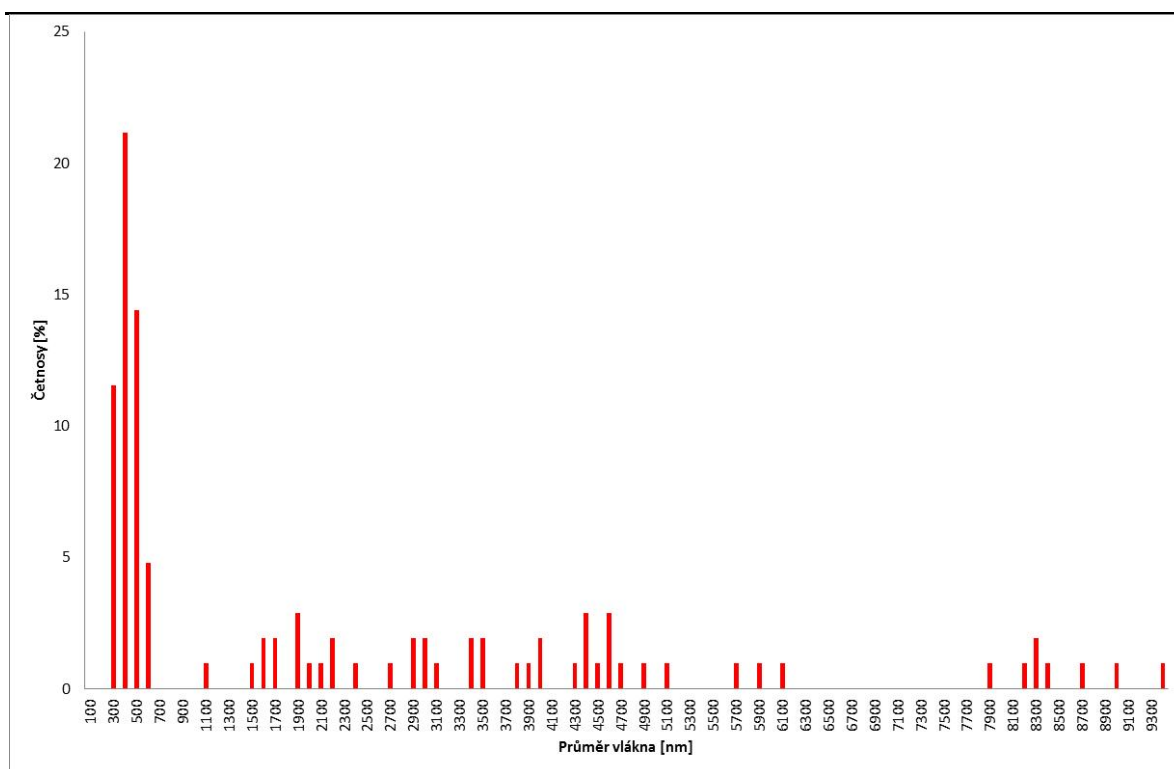
Obr. 36: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 30 % hm. ethanol



Obr. 37: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 20 % hm. ethanol

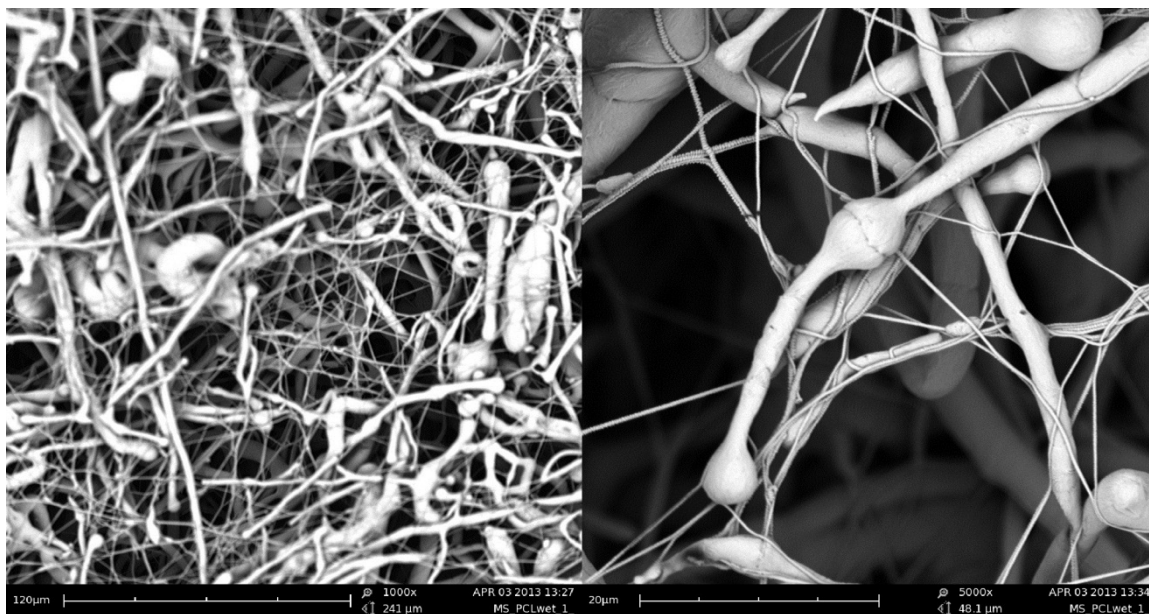


Obr. 38: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor 10 % hm. ethanol



Obr. 39: Závislost četnosti vláken na jejich průměru, kolektor destilovaná voda

Příloha B - Snímky z elektronového mikroskopu vzorků připravených do koagulačních lázní s různými koncentracemi ethanolu



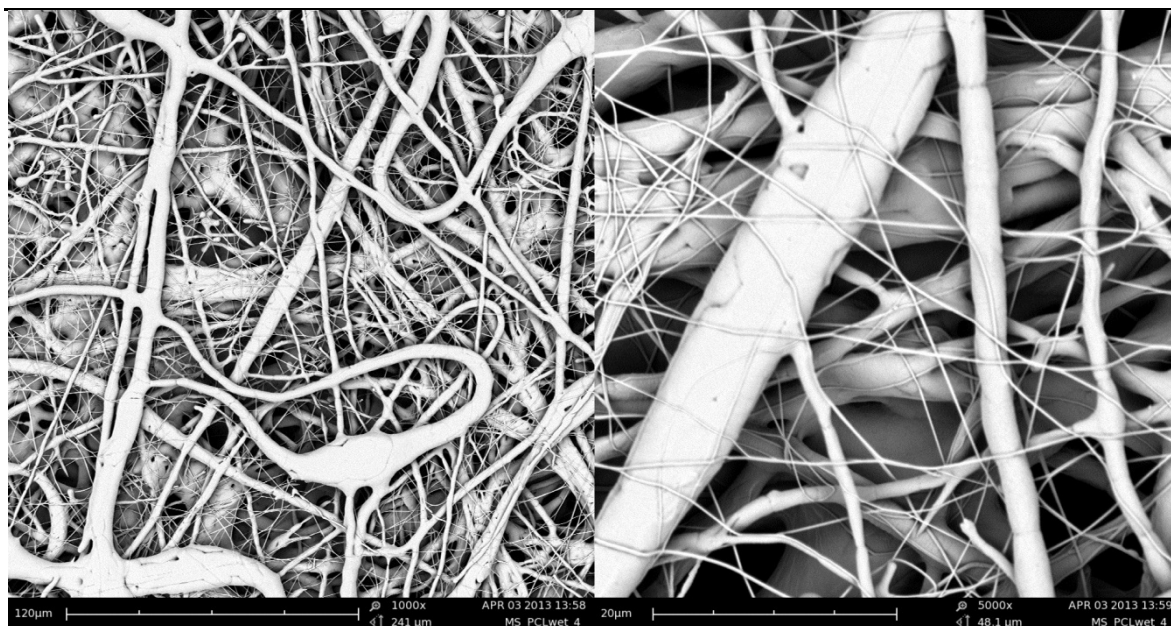
Obr. 40: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem s koncentrací 100 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 µm vlevo a 20 µm vpravo



Obr. 41: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 90 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



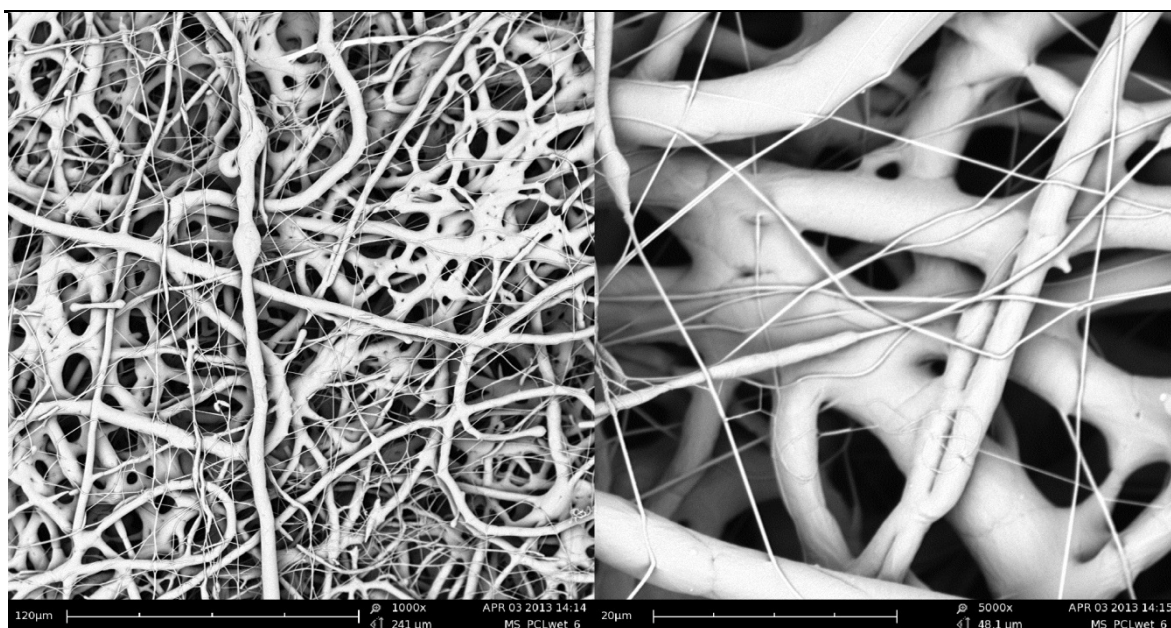
Obr. 42: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 80 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



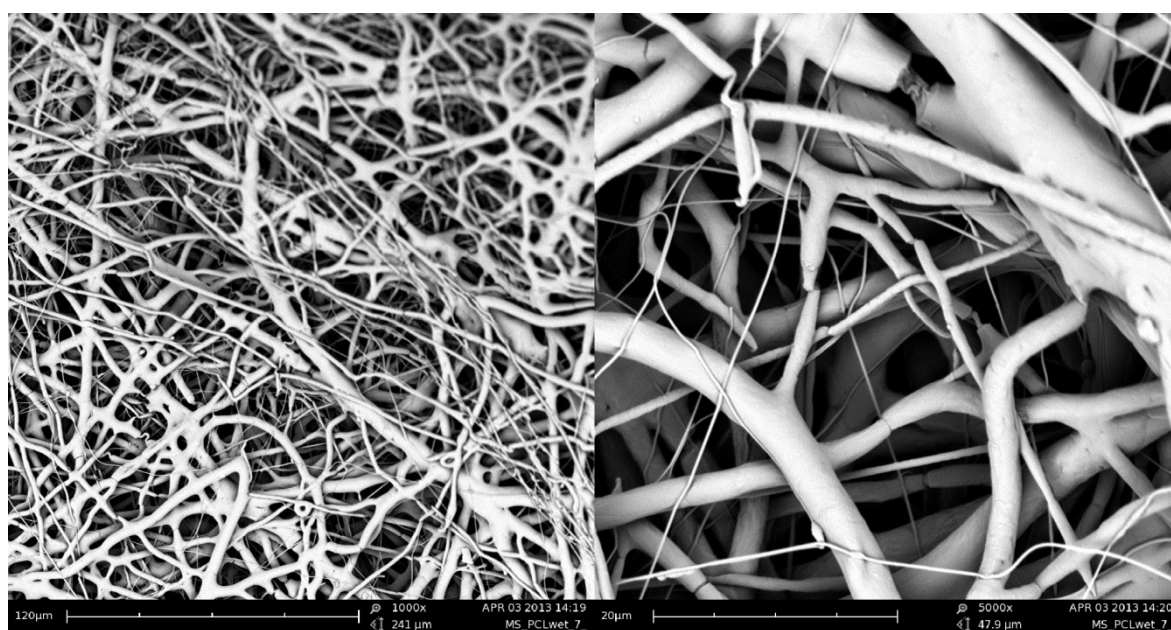
Obr. 43: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 70 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



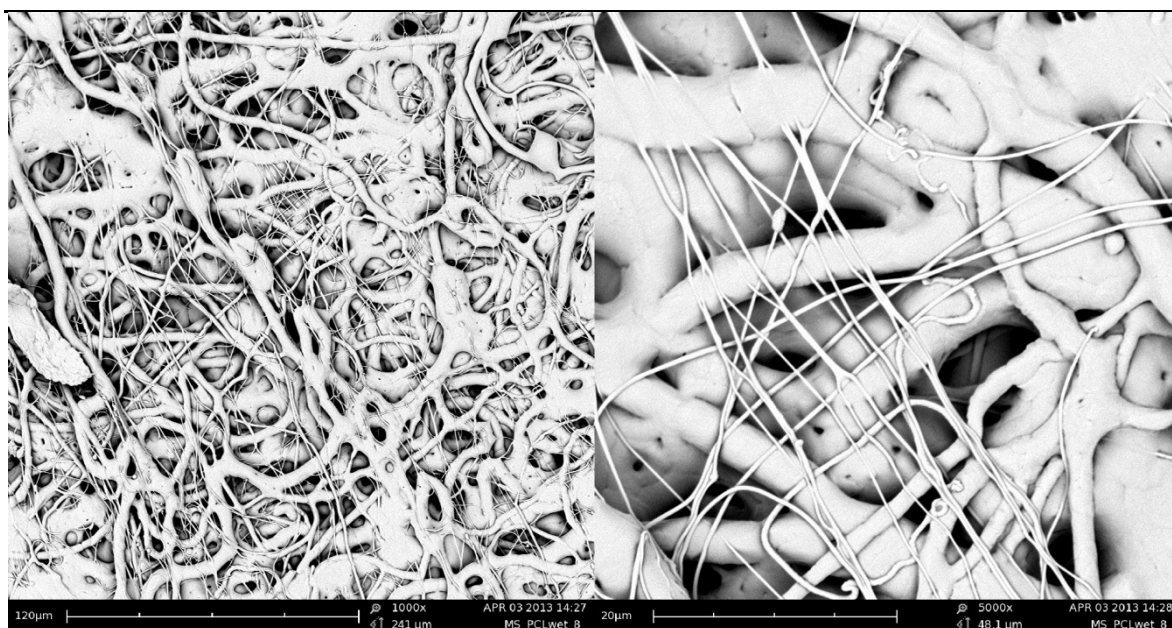
Obr. 44: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 60 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



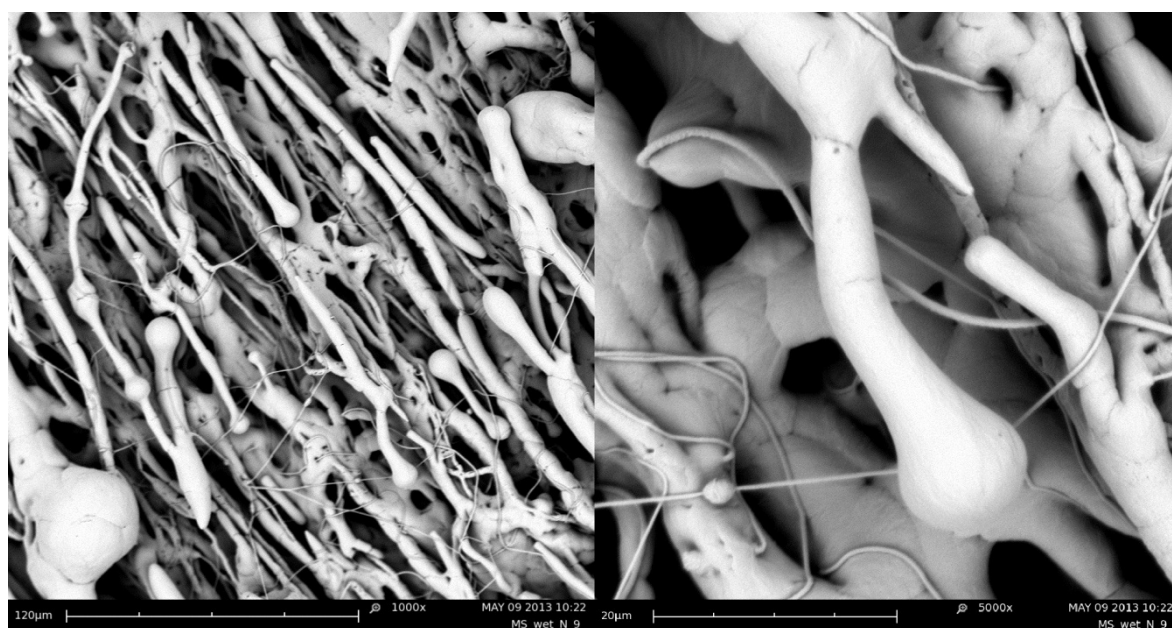
Obr. 45: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 50 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



Obr. 46: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 40 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



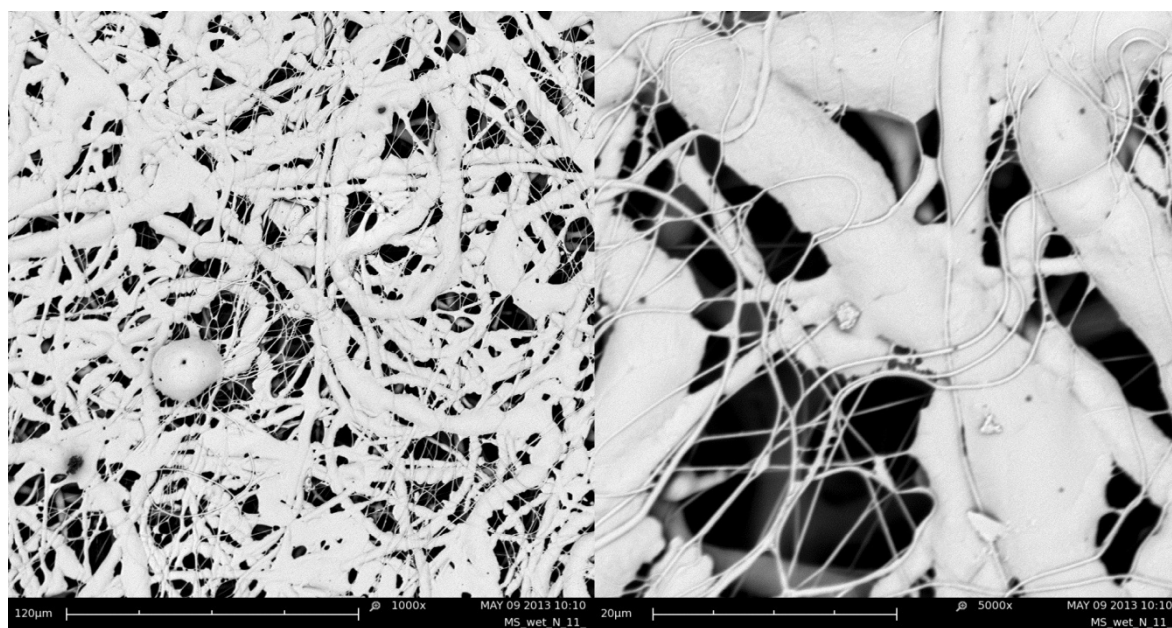
Obr. 47: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 30 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



Obr. 48: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 20 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



Obr. 49: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem 10 % hm. ethanolu snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo



Obr. 50: Nanovláknenné struktury z PCL připravené elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny s kolektorem tvořeným roztokem destilované vody snímky ze SEM, měřítko 120 μm vlevo a 20 μm vpravo